

Untersuchungen bei Personen mit Diabetes mellitus Typ I und deren  
Verwandten ersten Grades zur spezifischen Proliferation der Lymphozyten auf  
körpereigene Antigene

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Birthe Dagmar Neetzel

aus Brake/Unterweser

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik III und Poliklinik  
Leiter : Prof. Dr. R.G. Bretzel  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter : Prof. Dr. Dr. h.c. Federlin

Gutachter : PD Dr. Wudy

Tag der Disputation: 19. Februar 2003

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
1.1 Definition und Unterteilung des Diabetes mellitus	1
1.2 Ätiologie des Diabetes mellitus Typ I	8
1.2.1 Vererbung des Diabetes mellitus Typ I	8
1.2.2 Umwelteinflüsse	11
1.3 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I	18
1.3.1 Histologie der Langerhans'schen Inseln	18
1.3.2 Untersuchungen zur Insulitis	18
1.3.3 Autoantikörper und Autoantigene bei Diabetes mellitus Typ I	20
1.3.4 Die Rolle der Lymphozyten	26
1.4 Ziel der Arbeit	30
<b>2 Material</b>	<b>31</b>
2.1 Humane Lymphozyten und autologe Seren	31
2.2 Geräte	33
2.3 Reagenzien	35
2.4 Lösungen und Medien	37
2.4.1 Gewinnung peripherer, humaner Lymphozyten	37
2.4.2 Auszählung und Überprüfung der Vitalität der Lymphozyten	38
2.4.3 Isolierung der 64kD- Fraktion aus humanen Inselzellen	38
2.4.4 Herstellung der Antigen- und Lektin- Lösungen	39

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
3.1	Isolierung humaner, peripherer Lymphozyten	41
3.2	Auszählung und Überprüfung der Vitalität der Lymphozyten	42
3.3	Inselzell- Antikörper- Bestimmung	43
3.4	Gewinnung von Humanserum	44
3.5	Herstellung eines Serumpools	44
3.6	Die gemischte Lymphozytenkultur zur Überprüfung des gesammelten Serums auf Zytotoxizität	45
3.7	Kryokonservierung von Lymphozyten	47
3.8	Auftauvorgang der Lymphozyten nach der Kryokonservierung	47
3.9	Homogenisierung humaner Inselzellen	48
3.10	Ultraschall- Homogenisierung humaner Inselzellen	49
3.11	Isolation der 64kD- Fraktion aus humanen Inselzellen	50
3.12	Bildung antigen- spezifischer T- Zelllinien	52
3.13	Zweiter Stimulationszyklus	54
3.14	Antigen- spezifische Proliferation von T- Zelllinien	55
3.15	Statistische Auswertung	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Altersverteilung der Gruppen	60
4.2	Geschlechtsverteilung der Gruppen	61
4.3	Inselzell- Antikörper- Bestimmung	61
4.4	Lymphozytenzahlen	62
4.5	Zellkultur und Zellwachstum	63
4.6	Die gemischte Lymphozytenkultur	67

4.7	Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Tetanol 1% als Recall- Antigen	72
4.7.1	Proliferative Antwort auf Tetanol 1% als spezifisches Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm), Medium und PHA als Kontrollen	73
4.7.2	Vergleich der Proliferationsindizes auf Tetanus 1% als spezifisches Antigen innerhalb der drei Gruppen	75
4.7.3	Statistische Auswertung der Proliferationsindizes	76
4.7.4	Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes	76
4.7.5	Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titors	77
4.8	Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Inselhomogenat als spezifisches Antigen	78
4.8.1	Proliferative Antwort auf Inselhomogenat als spezifisches Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm), Medium und PHA als Kontrollen	78
4.8.2	Vergleich der Proliferationsindizes auf Inselhomogenat als spezifisches Antigen innerhalb der drei Gruppen	80
4.8.3	Statistische Auswertung der Proliferationsindizes	82
4.8.4	Auswertung Responder versus Non- Responder	82
4.8.5	Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titors	82
4.8.6	Proliferative Antwort auf Ultraschall- homogenisierte humane Inseln	83
4.8.7	Zweiter Stimulationszyklus	86

4.9	Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf 64kD	89
4.9.1	Proliferative Antwort auf 64kD als spezifisches Antigen, dargestellt in counts per minute (cpm), Medium und PHA als Kontrollen	89
4.9.2	Vergleich der Proliferationsindizes auf 64kD als spezifisches Antigen zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen	90
4.9.3	Statistische Auswertung der Proliferationsindizes	92
4.9.4	Auswertung Responder versus Non- Responder	92
4.9.5	Proliferative Antwort der Zelllinien auf 64kD als spezifisches Antigen in Abhängigkeit des ICA- Titers	92
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
5.1	Auswahl der Testpersonen	93
5.2	Alter der Testpersonen	96
5.3	Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppen	96
5.4	Antikörper- Bestimmungen	96
5.5	Periphere Lymphozyten	98
5.6	Antigen- spezifische T- Zellreaktivität	99
5.6.1	T- Zell spezifische Reaktivität auf Tetanus- Toxoid als Recall- Antigen	99
5.6.2	Spezifische T- Zell- Proliferation auf Inselzellhomogenat	100
5.6.3	Spezifische T- Zell- Proliferation auf Glutaminsäure-Decarboxylase	104
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>111</b>

<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Lebenslauf	139
	Danksagung	140

# 1 Einführung

## 1.1 Definition und Unterteilung des Diabetes mellitus

### *Definition*

Mit Diabetes mellitus ist eine heterogene Gruppe von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels bezeichnet, die definiert ist durch eine chronische Hyperglykämie und deren Folgen bezüglich anderer Stoffwechselprozesse und Organschäden.

### *Pathophysiologie*

Die Ursache dieser chronischen Hyperglykämie besteht in einem relativen oder absoluten Insulinmangel.

Insulin wird in den Beta- Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und reguliert die Verteilung und Aufnahme der mit der Nahrung zugeführten Substrate in die Energiedepots. Es wird unmittelbar nach der Aufnahme von Kohlenhydraten mit der Nahrung über die gesteigerte Glukosekonzentration im Plasma ausgeschüttet. Unter seiner Einwirkung kommt es zu einer verstärkten Aufnahme von Monosacchariden (v.a. Glukose), Aminosäuren und Fettsäuren in Leber sowie Fett- und Muskelgewebe. In diesen Organen wird unter der Wirkung von Insulin Glukose zu Glykogen umgebaut, gleichzeitig wird der Glykogenabbau gehemmt. Durch diese Wirkungen sinkt die nach Nahrungsaufnahme erhöhte Glukosekonzentration rasch wieder ab, Insulin wird folglich nicht mehr ausgeschüttet. Benötigt der Körper in den nächsten Stunden ohne Nahrungsaufnahme Energie, kann das Glykogen –wegen fehlender Insulinwirkung– wieder in Glukose umgewandelt, in die Blutbahn gelangen bzw. von den Muskelzellen metabolisiert werden.



Im Fettgewebe hemmt Insulin desweiteren die Lipolyse und steigert die Bildung von Fettsäuren bzw. Lipiden. Auf den Proteinstoffwechsel wirkt Insulin mit einer Steigerung der Proteinbiosynthese.

Bei Insulinmangel fehlt die zelluläre Aufnahme der Glukose, ihre Umwandlung und damit Speicherung in Glykogen, die Aufnahme und Speicherung von Fettsäuren im Fettgewebe sowie die Aufnahme von Aminosäuren und die Bildung von Proteinen. Es resultiert eine Erhöhung des Glukosespiegels im Blut, die Ausscheidung von Glukose mit dem Urin ist erhöht. Die Glukosurie ist aus osmotischen Gründen von einer vermehrten Diurese begleitet, die zu Exsikkose und Elektrolytverlusten führt. Trotz des erhöhten Blutglukosespiegels können wegen fehlender Insulinwirkung Leber, Muskel- und Fettgewebe keine Glukose aufnehmen und leiden unter Glukosemangel. Der Glukosebedarf muß daher über eine Gluconeogenese aus Aminosäuren sowie über eine gesteigerte Lipolyse gedeckt werden. Eine Verwertung des dabei entstehenden Acetyl- CoA ist wegen des gehemmten Glukosestoffwechsels jedoch nicht möglich, es resultiert eine vermehrte Bildung von Ketonkörpern.

Die Symptome dieser Stoffwechselentgleisung sind Müdigkeit und Schwächegefühl, Gewichtsabnahme, Polyurie und Polydypsie. Eine Überbeanspruchung der Alkalireserve durch Ausscheidung der Ketonkörper kann zur metabolischen Ketoazidose bis hin zum ketoazidotischen Koma führen.

### *Unterteilung*

Seit 1997 wird der Diabetes mellitus nach ätiologischen Gesichtspunkten klassifiziert (The Expert Committee, 1997).

Als Diabetes mellitus Typ I wird dabei der immunvermittelte Diabetes bezeichnet, der durch eine autoimmune Zerstörung der Beta- Zellen des Pankreas bedingt ist. Er ist gekennzeichnet durch einen absoluten Insulinmangel.

Im Gegensatz dazu ist der Diabetes mellitus Typ II durch eine variable Kombination von relativem Insulinmangel und Insulinresistenz gekennzeichnet.

Eine dritte große Gruppe des Diabetes mellitus umfasst andere spezifische Typen, zu denen genetische Defekte der Funktion der Beta- Zellen und der Insulinwirkung sowie Erkrankungen des exokrinen Pankreas und Endokrinopathien zählen. Auch ein Diabetes mellitus, ausgelöst durch Medikamente, Chemikalien oder Infektionen wird zu dieser dritten Gruppe gezählt. Ebenso werden ungewöhnliche Formen des immunvermittelten Diabetes (z.B. das Stiff- man- Syndrom) und andere genetische Syndrome, die mit einem Diabetes assoziiert sind, hier klassifiziert.

Die vierte Hauptgruppe repräsentiert den Gestationsdiabetes.

### *Diabetes mellitus Typ II*

In mehr als 80% der Fälle liegt ein Diabetes mellitus Typ II vor, seine Prävalenz beträgt in Mitteleuropa etwa 4% (Siegenthaler et al., 1992). Zwillingsuntersuchungen lassen auf eine genetische Prädisposition für den Typ II Diabetes schließen, da in 90% der Fälle beide Geschwister an Typ II Diabetes erkranken, wobei diese Disposition nicht HLA assoziiert ist (Claasen et al., 1993).

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ II besteht in erster Linie aus dem Versuch der diätetischen Blutzuckerregulation, wobei bei übergewichtigen Patienten zunächst eine Gewichtsreduktion anzustreben ist. Dies sollte durch eine Steigerung der körperlichen Aktivität begleitet sein. Dadurch wird eine Verminderung der Insulinresistenz und damit eine deutliche Verbesserung der Stoffwechselsituation erzielt.

Sind die Möglichkeiten der Behandlung durch Ernährungsumstellung, Gewichtsreduktion und Steigerung der körperlichen Aktivität ausgeschöpft, ist eine medikamentöse Therapie erforderlich. Dabei können Glukose-resorptionsverzögernde Substanzen (Alpha- Glukosidasehemmer),

Sulfonylharnstoffe, welche die Insulinsekretion der Beta- Zelle stimulieren, und Metformin eingesetzt werden. Letzteres, zur Gruppe der Biguanide gehörend, hemmt die endogene Glukoseproduktion und steigert die Aufnahme von Glukose in Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Neuere orale Antidiabetika sind Glinide, die eine schnell und kurzdauernde Insulinsekretion nach Glukosereiz induzieren, und Glitazone, die die Insulinresistenz senken. Bei unzureichendem oder unzureichend gewordenem Ansprechen auf orale medikanetöse Maßnahmen wird der Einsatz von Insulin erforderlich.

### *Immunvermittelter Diabetes mellitus Typ I*

Der Typ I Diabetes manifestiert sich vornehmlich im jugendlichen Alter. Es gibt jedoch eine weitere Form, die sich im Erwachsenenalter langsamer manifestiert, man spricht vom „latenten Autoimmun- Diabetes der Erwachsenen“ (late onset Autoimmune Diabetes of the Adult, LADA). Neuere Studien haben ergeben, dass dieser Diabetes im Erwachsenenalter häufiger vorkommt als bislang angenommen, er wurde oft als Typ II Diabetes verkannt. Nach Hauner ist der LADA für 10-15% aller Diabetesmanifestationen im mittleren und höheren Lebensalter verantwortlich (Hauner, 1998).

Vom Diabetes mellitus Typ I sind beide Geschlechter zu gleichen Teilen betroffen. Die Inzidenz ist, vor allem in den entwickelten Ländern, steigend (Green et al., 1992; Craig et al., 2000; Gardner et al., 1997; Tuomilehto et al., 1999; Bingley et al., 1989). Pathogenetisch beobachtet man den immun-medierten Untergang der insulinproduzierenden Beta- Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, der zum totalen Insulinmangel führt. Die Standardtherapie besteht in der lebenslangen Substitution einer individuellen Tagesdosis von Insulin nach verschiedenen Therapiekonzepten. Neuere Therapieansätze sind die Pankreastransplantation (Robertson et al., 2000) sowie die Transplantation von Inselzellen (Inoue et al., 2000; Robertson, 2000). Bis Ende des Jahres 1998 wurden dem International Pancreas Transplant

Registry (IPTR) in Minneapolis, USA, mehr als 11.000 Pankreasorgan-Transplantationen bei Typ I Diabetikern gemeldet (Bland, 1999). Eine erhaltene Pankreastransplantatfunktion führt zu Unabhängigkeit von Insulininjektionen, normalen Blutzuckertagesprofilen und normalen oder Norm- nahen HbA1c-Werten (Robertson et al., 2000). Es konnten positive Effekte im Hinblick auf das Neuauftreten und die Progredienz diabetischer Organschäden gezeigt werden (Robertson et al., 2000). Problematisch ist bei der Pankreastransplantation jedoch weiterhin die hohe chirurgische Komplikationsrate.

Im Gegensatz dazu ist die Inselzelltransplantation eine komplikationsärmere Methode. Es werden Inseln von meist nur einem Spenderorgan in Lokalanästhesie mittels Seldinger- Kathetertechnik transkutan- transhepatisch über das Pfortadersystem in die Leber eingeschwemmt (Weimar et al., 1999). Erste Versuche dazu nahm Minkowski 1892 vor. Er beobachtete eine verminderte Glukosurie nach subcutaner Implantation autologer Pankreas-Partikel in Hunde, denen zuvor das Pankreas entnommen worden war (Minkowski, 1892). Lacy und Kostianovsky beschrieben 1967 die Isolation von Inselzellen bei Ratten (Lacy et al., 1967) und Younoszai und Kollegen berichteten 1970 von der ersten Transplantation solch isolierter Inseln bei erwachsenen Ratten mit konsekutiver Abnahme der Glukosurie in einigen Fällen (Younoszai et al., 1970). Die erste Inselzelltransplantation beim Menschen wurde von Najarian 1977 beschrieben (Najarian et al., 1977). Scharp berichtete 1991 erstmals über eine völlige Insulinunabhängigkeit nach Inselzelltransplantation bei einem Typ I Diabetiker (Scharp et al., 1991). Seit 1988 lassen sich nach der Methode von Ricordi über ein automatisiertes Verfahren zur Inselisolierung mittels des Enzyms Kollagenase mehrere hunderttausend Inseln aus einem Spenderorgan isolieren (Ricordi et al., 1988). Mittlerweile liegen dem International Islet Transplant Registry (ITR) an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen über 377

humane Inselzelltransplantationen bei Typ I Diabetikern im Zeitraum von 1974 bis Ende 1999 vor (Brendel et al., 2000). Unser Zentrum in Gießen nimmt dabei mit 61 Inselzelltransplantationen weltweit die Spitzenstellung ein. Eine Insulinunabhängigkeit wurde nach dem Register in Gießen in den letzten 10 Jahren in 10% der Fälle nach Inselzelltransplantation erreicht (Brendel et al., 2000).

Im Tiermodell an der Ratte konnte gezeigt werden, dass durch eine frühzeitig nach Ausbruch des Diabetes erfolgte Inselzelltransplantation, Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus verhindert werden können (Federlin et al., 1984; Bretzel et al., 1992). Leider ist beim Menschen die langjährige Funktion der transplantierten Inselzellen, vermutlich auf dem Boden immunologischer Vorgänge, noch limitiert (Federlin et al., 2001).

Die großen Probleme der Inselzell- und Pankreasorgan- Transplantation liegen weiterhin in der begrenzten Spenderorganverfügbarkeit und der erforderlichen lebenslangen Immunsuppression zur Unterdrückung einer Abstoßungsreaktion.

### *Diabetische Folgeerkrankungen*

Bedingt durch die Stoffwechselveränderungen beim Diabetes mellitus kommt es zur Entstehung einer Mikro- und Makroangiopathie.

Die diabetische Mikroangiopathie beruht auf einer Diabetes- typischen Veränderung an den Kapillaren, man spricht auch von einer diabetischen Kapillaropathie. Sie ist gekennzeichnet durch einen Perizytenverlust, eine Basalmembranverdickung und eine Vermehrung der extrazellulären Matrix. Die Basalmembranverdickung ist verursacht durch eine Dysregulation der Basalmembransynthese: einige Komponenten der Basalmembran, wie Kollagen IV und Laminin werden vermehrt, das negativ geladene Heparansulfat Proteoglykan wird vermindert synthetisiert. Es resultiert eine zwar verdickte, jedoch permeablere Basalmembran, die besonders für Albumin durchlässig ist. Die Vermehrung der extrazellulären Matrix entsteht ebenfalls durch eine

Dysregulation mit vermehrter Synthese von Fibronektin, Osteopontin und interstitiellen Kollagenen.

Die Kapillaropathie manifestiert sich an unterschiedlichen Organen, klinische Relevanz erhält sie an den Augen, den Glomerula der Nieren und den peripheren Nerven. Resultierende Erkrankungen sind die Retinopathathia diabetica, die diabetische diffuse und noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel- Wilson) und die diabetische Neuropathie.

Die diabetische Makroangiopathie gleicht morphologisch der Arteriosklerose und Atheromathose des Nicht- Diabetikers. Der wesentliche Unterschied zu Nicht- Diabetikern sind die zu einem früheren Zeitpunkt, ausgedehnter und auch mehr distal auftretenden Läsionen großer und kleiner Arterien. Die wichtigsten Folgezustände sind die koronare Herzerkrankung, Zerebralsklerose bis hin zur Enzephalopathie und periphere Durchblutungsstörungen bis hin zur diabetischen Gangrän.

Eine weitere Folgererkrankung des Diabetes mellitus ist die diabetische Fettleber. Ausgelöst durch eine vermehrte Lipolyse, bedingt durch den Insulinmangel, kommt es statt im Fettgewebe verstärkt in der Leber zu einer Resynthese von Triglyceriden.

Als Folge einer gestörten Granulozytenfunktion zeigt sich beim Diabetiker eine gesteigerte Infektanfälligkeit mit Furunkulose, Neigung zu Pilzinfektionen, Harnwegsinfekten, Pyelonephritiden und anderen Infektionen.

Auch wenn heute verschiedene Therapiekonzepte eine nahezu physiologische Insulinsubstitution ermöglichen, lassen sich die Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus nicht vermeiden. So ist die Lebenswartung von Typ I Diabetikern trotz optimaler Stoffwechseleinstellung um etwa ein Drittel gegenüber Normalpersonen verkürzt (WHO Report, 1985).

### *Soziale Aspekte*

Die Erkrankung an Diabetes mellitus Typ I bedeutet eine Einschränkung der Lebensqualität. Der Patient muss die Erkrankung in allen Bereichen seines Lebens wie Ernährung, Tagesplanung, sportliche Aktivitäten und Urlaubsplanung berücksichtigen. Die Berufswahl wird durch die Erkrankung eingeschränkt, bestimmte Berufe können nicht ausgeübt werden. Eine enge ärztliche Betreuung des Patienten ist erforderlich und im Vergleich zu Nicht-Diabetikern sind Krankenhausaufenthalte häufiger. Dennoch hat die moderne Diabetes- Therapie, v.a. die Schulungskonzepte, zu einer erheblich freieren Gestaltung des Lebens der Typ I Diabetiker geführt.

Aufgrund der zahlreichen Folgeerkrankungen und ihrer Bedeutung für den Patienten muss aber weiterhin auf der Prävention des Diabetes mellitus Typ I ein Schwerpunkt der Forschung liegen.

## **1.2 Ätiologie des Diabetes mellitus Typ I**

### **1.2.1 Vererbung des Diabetes mellitus Typ I**

Die Ätiologie des Diabetes mellitus Typ I ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Einigkeit herrscht jedoch in der Ansicht, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischer Prädisposition handelt (Graves et al., 1999; Chowdhury et al., 1999; Knip et al., 1999; Rennert et al., 1999).

Hinweise darauf lieferten Familienstudien, die in 20% der Fälle eine positive Familienanamnese (Palmer et al., 1991), sowie eine deutlich erhöhte Inzidenz bei Geschwistern von Typ I Diabetikern aufzeigten (Cudworth et al., 1982).

Zur genaueren Evaluierung der genetischen Prädisposition können Untersuchungen am HLA- System (human leucocyte antigen system) herangezogen werden. Das HLA- System ist ein autosomal kodominant vererbtes System von Gewebsantigenen, die sich auf den Zellen fast aller Gewebe, besonders gut auf Leukozyten, nachweisen lassen. Sie werden kodiert durch den HLA- Genkomplex (den sogenannten

Haupthistokompatibilitätskomplex oder MHC), welcher auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert ist. Für diesen Genkomplex besteht ein ausgeprägter Polymorphismus, sodass eine große Anzahl verschiedener HLA-Phänotypen existiert. Im HLA- Genkomplex werden bislang vier Hauptregionen (HLA-A,-B,-C und -D) unterschieden. Die Allele der A-, B- und C- Region kodieren Antigene, die sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen, an Retikulozyten und an reifen Erythrozyten nachweisen lassen. Sie werden als Klasse I Antigene bzw. als MHC- Moleküle der Klasse I bezeichnet. Mit Hilfe der MHC I Moleküle sind die Zellen in der Lage, Fremdproteine zu präsentieren, wodurch zytotoxische T- Lymphozyten aktiviert werden, die dann die betreffende Zelle lysieren.

Die Gene der HLA- D- Region codieren ebenfalls Gewebsantigene, die sich von den biochemisch untereinander sehr ähnlichen ABC- Genprodukten unterscheiden und ihnen deshalb als Klasse II Antigene gegenübergestellt werden. Im Gegensatz zu den Klasse I Antigenen finden sie sich vornehmlich an B- Lymphozyten sowie an Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen und an Endothelzellen. Man unterscheidet HLA-DR-, DP- und DQ- Antigene, kodiert von Allelen auf verschiedenen, synonym bezeichneten Subregionen des HLA-D- Komplexes. Durch Präsentation von Antigenen in Verbindung mit MHC II Molekülen werden T-Helfer- Lymphozyten aktiviert, die ihrerseits B- Lymphozyten zur Produktion von spezifischen Antikörpern anregen und T- Lymphozyten zu zytotoxischen T- Lymphozyten und T-Suppressor- Zellen aktivieren.

Die ersten Untersuchungen, die einen möglichen Zusammenhang zwischen dem HLA- System und Diabetes mellitus Typ I evaluierten, zeigten, dass die Gene der HLA- D Region von größerer Bedeutung für die genetische Prädisposition sind (Thomsen et al., 1975). So wiesen 90% der an Typ I Diabetes erkrankten Personen die HLA- Merkmale DR3 und / oder DR4 auf - gegenüber 45-55% der



Gesunden. Weiterhin beobachtete man einen hohen Anteil an HLA-DR3/4 heterozygoten Patienten (Bertrams 1984; Palmer et al., 1991; Svejgaard et al., 1975; Svejgaard et al., 1983). Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Regionen HLA-DQ und -DR von großer Bedeutung sind. Sie zeigten auf, dass die Haplotypen DR4-DQ8 und DR3-DQ2 mit einem hohen Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I verbunden sind, vor allem, wenn sie zusammen vorkommen. (Undlien et al., 1997 und 1999). Allerdings tragen circa 10% der Typ I Diabetiker keinen dieser Hochrisiko- Haplotypen. Die Genotypisierung anderer Allele, die in Verbindung mit dem Typ I Diabetes mellitus gebracht werden (DRB1, DQA1, DQB1) ergaben bei diesen Patienten weitere risikobehaftete Haplotypen (Undlien et al., 1999).

Im Gegensatz dazu gibt es Individuen, die den Haplotyp DR4-DQ8 tragen, ohne einen Typ I Diabetes mellitus zu entwickeln. Subanalysen ergaben, dass es neben risikobehafteten Genen auch solche gibt, die protektiv wirken (Undlien et al., 1997). Auch andere Untersucher fanden Haplotypen, die protektiv gegen die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I wirken (Pugliese et al., 1999; Roep et al., 1999). Roep beschrieb, dass HLA-DRB1\*0403 streng assoziiert ist mit einem dominanten Schutz gegen die Entwicklung eines Diabetes mellitus, sogar in Verbindung mit dem risikobehafteten HLA-DR4-DQ8 Phänotyp (Roep et al., 1999).

Einigkeit herrscht in der Ansicht, dass nicht die Erkrankung an sich, sondern nur die Disposition zur Entwicklung eines Typ I Diabetes vererbt wird. Diese Schlussfolgerung stützt sich auf folgende Untersuchungsergebnisse, die zeigen, dass das HLA- System alleine nicht für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes verantwortlich sein kann :

Erstens: Die Assoziation zwischen Typ I Diabetes und den HLA- Merkmalen sind weltweit nicht konstant. In Süd- Indien besteht z.B. ein gehäuftes Vorkommen an HLA-DR3 und -DR4 positiven Individuen, jedoch kein

erhöhtes Risiko für den Typ I Diabetes bei diesen Personen (Serjeatson, 1987). In Japan und China ist die Diabetes- Inzidenz u.a. mit dem HLA-Merkmal DRw9 assoziiert (Chan et al., 1985; Bertrams, 1984).

Zweitens: Die Konkordanzrate für HLA- identische Geschwister liegt bei 10-20% und ist damit signifikant niedriger als die Konkordanzrate für genetisch nicht identische Zwillinge, die bei 36% liegt. (Barnett et al., 1981; MacLaren, 1992).

Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass nicht die als risikobehaftet bezeichneten Gene selbst, sondern die eng mit ihnen gekoppelt vererbten Gene, die nicht mit dem HLA- System assoziiert sind, für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich sind. Mittlerweile wird für mehr als 15 Gene eine Assoziation mit dem Diabetes mellitus Typ I beschrieben (Pugliese, 1999). Es ist möglich, dass eine Kombination aus HLA und anderen genetischen Faktoren, die Entwicklung des Typ I Diabetes mellitus verstärken oder abschwächen. In der Diskussion stehen vor allem das Insulin- Gen auf dem Chromosom 11 (Bell et al., 1984; Bennett et al., 1995) sowie das cytotoxische T-lymphocyte antigen (CTLA-4) Gen auf Chromosom 2 (Nistic et al., 1996).

### **1.2.2 Umwelteinflüsse**

Wird nun nicht die Erkrankung an sich, sondern nur die Disposition zur Entwicklung eines Typ I Diabetes vererbt, müssen andere Einflüsse eine Rolle spielen. Die Beobachtung, dass die Inzidenz des insulinpflichtigen Diabetes mellitus in verschiedenen Ländern unterschiedlich ist (Trevisan et al., 1998; Green et al., 1992), führte zu dem Schluss, dass Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auch die Tatsache, dass sich in den vergangenen Jahren in mehreren Ländern eine Zunahme der Inzidenz der Erkrankung zeigte, machen wirtschaftliche, soziale und ökologische Einflussfaktoren wahrscheinlich (Tuomilehto et al., 1999; Gardner et al., 1997; Craig et al., 2000).

Die Registratur der Typ I Diabetiker- Fälle in unterschiedlichen Ländern der Welt ermöglichten Untersuchungen der verschiedensten Einflüsse der Umweltfaktoren auf die Inzidenz der Erkrankung. Allerdings werden nicht in allen Ländern der Welt, v.a. in Afrika, Südamerika und Asien, Daten über das Auftreten des juvenilen Diabetes mellitus erhoben (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988).

### *Geographische Einflüsse*

Diabetes mellitus Typ I ist eine weltweit auftretende Erkrankung. Dennoch zeigten epidemiologische Studien unterschiedliche Inzidenzraten in verschiedenen Ländern. Die höchsten Inzidenzraten finden sich in nördlichen Ländern, v.a. in Finnland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern (Tuomilehto et al., 1999; Green et al., 1992). Es scheint ein Nord- Süd- Gefälle zu bestehen, so sind in Mazedonien nur wenige Typ I Diabetiker registriert (Kocova et al., 1993). In Ost- Europa bestehen niedrigere Erkrankungsraten (Green et al., 1992). Es bestehen jedoch auch große Unterschiede zwischen benachbarten Regionen, die zu dem angenommenem Nord- Süd- Gefälle nicht passen. So besteht z.B. in Sardinien eine sehr hohe Inzidenz für den Diabetes mellitus Typ I mit Zahlen, die vergleichbar sind zu denen in Finnland (Green et al., 1992; Muntoni et al., 1995). Im Gegensatz dazu zeigt das benachbarte Italien deutlich niedrigere Zahlen. Ein weiteres Beispiel dafür ist Estland, ein Land, welches geographisch, ethnisch und kulturell mit Finnland vergleichbar ist. In Estland beträgt die Inzidenz für den Diabetes mellitus Typ I jedoch nur ein Drittel der von Finnland (Trevisan et al., 1998).

In Bezug auf das bestehende Nord- Süd- Gefälle wird als Ursache die herrschende Jahresdurchschnittstemperatur diskutiert (Diabetes Epidemiology Research International Group 1988). Hinweisgebend dafür sind Versuche von Williams, der die Inzidenz von Diabetes im Tiermodell durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur senken konnte (Williams et al., 1990). Andere

Erklärungsansätze könnten unterschiedliche Ernährungsweisen oder von der Geographie abhängige virale Einflüsse sein.

### *Jahreszeitliche Einflüsse*

Neben unterschiedlicher geographischer Inzidenzraten fielen in epidemiologischen Studien auch jahreszeitliche Abhängigkeiten der klinischen Manifestation des Typ I Diabetes auf. Die Manifestation der Erkrankung fällt häufiger in die Herbst- und Wintermonate, v.a. während der Pubertät (Levy-Marchal et al., 1995). Auch in dem Colorado IDDM Registry beobachtete man einen Gipfel des Ausbruchs der Erkrankung im Winter (Hamman et al., 1990). Laron machte darauf aufmerksam, dass diese jahreszeitlichen Schwankungen vornehmlich in Ländern mit hoher Inzidenz für den Diabetes mellitus Typ I nachweisbar sind. In Ländern mit niedrigen Inzidenzraten war diese Saisonabhängigkeit nicht nachweisbar. Er folgerte, dass dies möglicherweise durch virale Infekte verursacht wird, die in den Ländern mit hoher Inzidenzrate in den Herbst- und Wintermonaten vermehrt auftreten, gegen die in den Ländern ohne saisonale Schwankungen eine Toleranzentwicklung stattgefunden hat (Laron, 1999).

### *Virale Einflüsse*

Unterschiedliche Studien zeigten einen zeitlichen Zusammenhang zwischen verschiedenen Virusinfektionen und der Diabetesmanifestation.

Blom beobachtete eine erhöhte Anzahl an durchgemachten Infektionen in dem Jahr vor der klinischen Manifestation des Diabetes bei Kindern (Blom et al., 1991). Viele respiratorische Virusinfektionen zeigen einen Gipfel im Winter äquivalent zur Manifestation des Diabetes (Huff et al., 1974).

Einige Case- Reports berichteten über das Auftreten einer Diabetes- Erkrankung nach einer Mumps- Infektion (Hinden, 1962, Mc Crae, 1963, Block et al., 1973).

Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Prävalenz des insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ I bei Kindern mit kongenitaler Röteln- Infektion (Menser et al., 1978; Ginsberg- Fellner et al., 1980). Bei der Abklärung dieser Befunde konnte Menser am Kaninchenmodell zeigen, dass die Nachkömmlinge von mit Röteln- infizierten Kaninchen niedrigere Spiegel an Insulin im Serum haben als die nicht- infizierte Kontroll- Population (Menser et al., 1978).

Besondere Beachtung fand auch das Cocksackie B- Virus, insbesondere das Cocksackie B4- Virus. Hinweise ergaben sich aus dem Vergleich des jahreszeitlichen Auftretens der Cocksackie- Infektionen und den Geburtsmonaten späterer Typ I Diabetiker (Mikulecky et al., 2000, Samuelsson et al., 1999). Weitere Aufschlüsse erhielt man aus Tierversuchen :

Bei Mäusen mit genetischer Prädisposition für einen Diabetes mellitus konnte durch das Cocksackie B4- Virus eine Infektion der Beta- Zelle und ihre Zerstörung ausgelöst werden (Horwitz et al., 1998). Bei bestimmten Affen war nach Infektion mit Cocksackie B4 eine verminderte Insulinsekretion verbunden mit erhöhten Blut- Glucosespiegeln nachweisbar (Yoon et al., 1986). Yoon konnte Cocksackie B4- Viren aus dem Pankreas von frisch manifestierten Typ I Diabetikern isolieren. Eine Injektion der isolierten Viren führte bei Versuchstieren zu Diabetes (Yoon et al., 1979; Yoon et al., 1978).

Eine schwedische Untersuchung zeigte, dass Kinder, bei deren Müttern zum Zeitpunkt der Entbindung Cocksackie B4- Virus- Antikörper vom Typ IgM nachweisbar waren, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I hatten (Dahlquist et al., 1995). Daraus ableitend wird diskutiert, ob eine fetale Infektion an Cocksackie B4 zur Zerstörung der Beta- Zellen und damit zum Diabetes mellitus Typ I führt. Ähnliche Schlüsse ließ eine Studie aus Finnland zu (Hyoty et al., 1995).

*In vitro* war nachweisbar, dass die T- Zell- Aktivität auf Proteine des Cocksackie B4- Virus bei Patienten mit Typ I Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Normalpersonen deutlich erhöht ist (Juhela et al., 2000; Klemetti et al., 1999).

Trotz vieler Untersuchungen auf diesem Gebiet, sowohl in Form von epidemiologischen Untersuchungen, Tierversuchen und Untersuchungen des Immunstatus der Typ I Diabetiker ist bislang der Einfluß von Viren (mit Ausnahme der Rubella- Viren) auf die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ I nicht gesichert. Unklar bleibt, ob eine Virusinfektion (und wenn ja, welche) tatsächlich ursächlich an der Erkrankung beteiligt ist, oder ob sie die Manifestation nur akzeleriert. Vielleicht ermöglichen aber auch die immunologischen Vorgänge, die letztendlich zum Diabetes mellitus Typ I führen, nur das Auftreten einer Virusinfektion, ohne dass diese in ursächlichem Zusammenhang zum Diabetes steht.

### *Ernährungsfaktoren*

In verschiedenen Studien zeigte sich eine positive Korrelation der Inzidenz des Typ I Diabetes mit der frühen Ernährung mit Kuhmilchprodukten bei kurzzeitiger oder ausgebliebener Stillzeit (Dahlquist et al., 1991; Borch- Johnsen et al., 1984; Virtanen, 1991; Virtanen et al., 1993; Dahl- Jorgensen et al., 1991; Kostabra et al., 1993). Allerdings gab es auch Untersuchungen, die einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen konnten, sodass die Diskussion kontrovers bleibt. So ergab eine prospektive Untersuchung in Australien keine Assoziation zwischen der Dauer des Stillen, der Zufuhr von Kuhmilchprodukten und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I (Couper et al., 1999).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer kurzzeitigen bzw. ausgebliebenen Stillperiode und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I könnte bedingt sein durch die fehlende Übertragung von immunkompetenten Stoffen mit der Muttermilch auf das Kind, so z.B. sekretorische IgA- Antikörper, Makrophagen, Lymphozyten und andere infektionsabwehrende Faktoren wie Neuraminsäure, Lysozym, Lactoferrin und Interferon. Es wäre denkbar, dass das Neugeborene durch den fehlenden protektiven Effekt der Muttermilch nicht ausreichend

immunisiert ist, sodass dadurch Infektionskrankheiten in der Pathogenese des Diabetes mellitus zur Bedeutung kommen können.

Aber nicht nur der schützende Effekt der Muttermilch kann als Erklärungsansatz für die Abhängigkeit der Inzidenz des insulinpflichtigen Diabetes von der Stillfrequenz herangezogen werden. Denn durch die frühe Zufuhr von Kuhmilchprodukten ist die Zufuhr eines den Diabetes auslösenden Agens denkbar. Im Tiermodell konnte bei BB- Ratten (BioBreeding; ein Inzuchtstamm, der einen spontanen Diabetes entwickelt) durch die frühe Zufuhr von Kuhmilchprodukten die Inzidenz des Diabetes erhöht, und durch kuhmilchfreie Ernährung gesenkt werden (Danemann et al., 1987; Elliott et al., 1984; Scott et al., 1997).

In der Diskussion über auslösende Faktoren in Kuhmilchprodukten steht v.a. das Rinder- Serum- Albumin (bovines Serum Albumin, BSA). Hinweisgebend dafür sind nachweisbare Antikörper gegen BSA sowohl bei prä- diabetischen BB- Ratten (Glerum et al., 1989), bei prä- diabetischen Mäusen (Beppu et al., 1987) als auch bei frisch- manifestierten Typ I Diabetikern (Saukkonen et al., 1994, Saukkonen et al., 1998).

Neben Rinder- Serum- Albumin ist ein weiteres Kuhmilchprotein, Casein, Gegenstand der Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass eine proteinfreie Ernährung im Tiermodell die Entstehung eines Diabetes verhindert, wohingegen eine Diät, die nur Casein als alleinige Proteinquelle enthält, die Diabetes- Entstehung fördert (Reddy et al., 1995; Elliott et al., 1988; Scott et al. 1997). Außerdem wurden bei Typ I Diabetikern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Autoantikörper gegen  $\beta$ - Casein nachgewiesen (Wasmuth et al., 1995).

Als weitere bedeutende Faktoren der Ernährung für die Ätiologie des Typ I Diabetes werden ein hoher Gehalt an Nitraten, Nitriten bzw. Nitrosaminen vermutet (Dahlquist et al., 1991). Dabei wurde nicht nur über die orale Zufuhr dieser Stoffe bei den Kindern selbst, sondern auch bei den Müttern, nämlich zum Zeitpunkt der Konzeption, als Ursache für die Entwicklung eines Typ I Diabetes bei den Kindern spekuliert. (Helgason et al., 1981).

#### *Lebensgewohnheiten als Einflußfaktoren*

Hägglöf berichtete über psychologischen Streß und psychisch belastende Ereignisse als Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ I Diabetes (Hägglöf et al., 1991).

Nach Dahlquist sind die Mütter diabetischer Kinder zum Zeitpunkt der Konzeption im Vergleich zu Kontrollpersonen häufiger über 40 Jahre alt (Dahlquist et al., 1991). Auch eine neuere Untersuchung zeigte, dass eine streng lineare Relation zwischen dem Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Entbindung und dem Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I besteht (Bingley et al., 2000). Mütter der an juvenilen Diabetes erkrankten Kinder sollen häufiger einen niedrigeren Bildungsstand aufweisen als Mütter nicht-diabetischer Kinder (Blom et al., 1989; Virtanen 1991). Dabei stellte Virtanen einen Zusammenhang zwischen Bildungsstand der Mutter, sozialer Schichtzugehörigkeit und Stillzeit her: Je höher der Bildungsstand der Mutter, um so länger sei die Stillzeit. Im Gegensatz dazu konnte für England und Irland in einer Studie von 1999 keine Abhängigkeit zwischen dem Entstehen eines Diabetes mellitus Typ I und der sozialen Schichtzugehörigkeit der Eltern evaluiert werden (Fear et al., 1999).



### **1.3 Pathogenese des Typ I Diabetes mellitus**

#### **1.3.1 Histologie der Langerhans'schen Inseln bei Diabetes mellitus Typ I**

1965 untersuchte Gepts Pankreasgewebe von verstorbenen Typ I Diabetikern. Bei kurz nach der Diagnosestellung Verstorbenen fanden sich peri- und intransuläre inflammatorische Infiltrate sowie eine Reduktion der Beta- Zellen. Bei Patienten mit längerer Krankheitsdauer waren dagegen Infiltrate nicht mehr und nur noch kaum Beta- Zellen nachweisbar (Gepts, 1965).

Die Infiltrate im Bereich der Langerhans'schen Inseln bei Typ I Diabetikern, man spricht von Insulitis, fand auch Foulis, der 1986 ebenfalls Pankreasgewebe von Typ I Diabetikern untersuchte. Auch seine Ergebnisse zeigten, dass mit zunehmender Dauer der Insulitis sowohl die Infiltrate als auch die Beta- Zellen abnehmen. Dieser Befund liess vermuten, dass die Beta- Zelldestruktion von dem Insulitis- Prozess verursacht wird (Foulis et al., 1986).

#### **1.3.2 Untersuchungen zur Insulitis**

Bottazzo untersuchte 1985 das Pankreasgewebe eines 12 jährigen Mädchens, welches kurz nach der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I verstorben war. Auch er konnte Insulitis- Infiltrate im Bereich der Langerhans'schen Inseln finden. Die qualitative Analyse des zellulären Infiltrats ergab das Überwiegen von zytotoxischen / Supressor- T- Lymphozyten. Weiterhin waren T- Helfer- Zellen und in geringerer Zahl auch andere T- Zell- Subpopulationen nachweisbar. Die große Mehrzahl der Lymphozyten (90 %) war aktiviert, was an der Expression von HLA-DR- Molekülen zu erkennen war (Bottazzo et al., 1985).

Botazzo machte bei seiner Untersuchung noch eine weitere interessante Beobachtung: Er konnte Immunglobuline vom Typ IgG im Pankreasgewebe nachweisen. Diese ummantelten die Inseln, teilweise waren sie aber auch im

Zytoplasma der Beta- Zellen nachweisbar. Diese Penetration der Immunglobuline in lebende Beta- Zellen und die HLA-DR- Expression der in den Infiltraten nachgewiesenen T- Lymphozyten wurde von ihm als spezifische Immunreaktion im Sinne einer antikörperabhängigen komplementvermittelten Zytotoxizität, die zur Betazell- Destruktion führt, interpretiert (Bottazzo et al., 1985).

Auch im Tiermodell der NOD (Non Obese Diabetic)- Maus, die 1980 von Makino entwickelt wurde und etwa im Alter von 12 Wochen einen autoimmunen Diabetes entwickelt (Makino et al., 1980) wird noch in der prä-diabetischen Phase eine Insulitis beobachtet (Castano et al., 1990). Sie tritt bei diesen Tieren etwa in der vierten Lebenswoche auf und führt zu einer Destruktion der Beta- Zellen mit konsekutiver Hyperglykämie (Kikutani et al., 1992; Bach, 1994; Miyazaki et al., 1985). Die Infiltrate der Insulitis bei der NOD- Maus setzen sich zusammen aus überwiegend  $CD4^+$  T- Lymphozyten und in geringerer Zahl aus  $CD8^+$  Zellen, B- Lymphozyten und Makrophagen (O'Reilly et al., 1991).

Weitere Untersuchungen sprechen dafür, dass die  $CD4^+$  T- Zellen verantwortlich sind für die Entwicklung zum Diabetes mellitus (Kurrer et al., 1997).

$CD4^+$  T- Zellen kann man in zwei große Subgruppen unterteilen :

Th (T- Helfer) 1- Zellen, die Interferon-  $\gamma$ , Interleukin- 2 und Tumor- Nekrose- Faktor-  $\beta$  sezernieren und Th2- Zellen, die die Interleukine 4, 5 und 10 sezernieren (Mosmann et al., 1986). Es ist bekannt, dass Th1- Zellen in der zellulären Immunität eine wichtige Rolle spielen (Abbas et al., 1996), ihre pathogenetische Rolle ist für viele Autoimmunerkrankungen bekannt (Überblick in Liblau et al., 1995 und Adorini et al., 1997).

Für die Differenzierung von  $CD4^+$ - Helfer- Zellen in Th1- bzw. Th2- Zellen spielt Interleukin- 12 eine dominante Rolle (Trinchieri, 1995; Paul et al., 1994).

Es wird von Neutrophilen, Makrophagen und anderen Zellen im Rahmen einer antigen- spezifischen Immunantwort sezerniert (Gately et al., 1998).

Anhand der nachgewiesenen Zytokin- Produktion durch die CD4<sup>+</sup>- Zellen des Insulitis- Infiltrates konnte bestimmt werden, dass diese Zellen einen Th1- Phänotyp haben (Adorini et al., 1997).

Auch andere Untersuchungen führten die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes zurück auf die pathogenetische Aktivität der Th1- Zellen (Healey et al., 1995; Liblau et al., 1995; Katz et al., 1995).

Am Tiermodell der NOD- Maus konnte gezeigt werden, dass Interleukin- 12 zur Akzeleration der Diabetes- Entwicklung führt. Diese Akzeleration war assoziiert mit einer vermehrten Produktion von Zytokinen von Th1- Zellen, die zum selektiven Untergang der Beta- Zellen führte (Trembleau et al., 1995).

Unklar bleibt die Rolle der Th2- Zellen. Sie sind vor allem zu Beginn der Insulitis als „peri- insulitisches“ Infiltrat nachweisbar. In einer späteren Phase der Insulitis sind keine Th2- Zytokine mehr nachweisbar, es herrscht dann ein „intra- insulitisches“ Infiltrat vor, bei dem nur noch Th1- Zytokine bestimmbar sind (Pilstrom et al., 1995). Diese könnten für die Destruktion der Beta- Zellen mit verantwortlich sein. Was die Umwandlung von der zunächst benignen Periinsulitis zur destruktiven Intrainsulitis bewirkt, ist weiterhin unklar.

### **1.3.3 Autoantikörper und Autoantigene beim Diabetes mellitus Typ I**

1974 entdeckte Bottazzo bei Typ I Diabetikern Antikörper, die sich gegen alle Zelltypen der Pankreasinseln richten ( Bottazzo et al., 1974). Dies gab Hinweise für den Einfluß immunologischer Faktoren bei der Pathogenese der Erkrankung.

Im weiteren Verlauf wurden Antikörper bei Typ I Diabetikern nachgewiesen, die sich gegen verschiedene Strukturen der Beta- Zelle der Langerhans'schen Inseln richten. Seitdem wird deren Rolle als Autoantigene sowie die Rolle der Autoantikörper im Prozeß der autoimmunologischen Destruktion der Beta- Zelle diskutiert.

### *Inselzell- Antikörper (Islet cell antibodies, ICA)*

Bottazzo entdeckte 1974 bei Typ I Diabetikern mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz Antikörper, die sich gegen alle Zellen der Pankreasinseln richten, die sogenannten Inselzell- Antikörper (Bottazzo et al., 1974).

Auch heute noch erfolgt die Bestimmung der ICA- Antikörper durch eine indirekte Immunfluoreszenz auf humanem unfixiertem, frisch gefrorenem Pankreas der Blutgruppe Null. Durch die Juvenile Diabetes Foundation International (JDF) wurde diese Nachweismethode weiter entwickelt und es ist bis heute durch Standardisierung und Einführung der sogenannten JDF- Standardeinheiten auch eine Quantifizierung der Antikörper im Serum möglich (Gleichmann et al., 1987).

Bei Typ I Diabetikern zeigte sich in allen Studien eine hohe Prävalenz der Inselzell- Antikörpern zum Zeitpunkt der Diagnose. Sie kann mit 60-90% angegeben werden (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989).

Innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnosestellung sinkt die Prävalenz auf 20-50% (Mustonen, 1984), bis schließlich, u.U. nach Jahrzehnten, die Inselzell- Antikörper ganz aus dem Serum der Diabetiker verschwinden (Lendrum et al., 1976).

Weltweit durchgeführte Familienstudien zeigten eine erhöhte Prävalenz von Inselzell- Antikörpern bei Verwandten ersten Grades von Typ I Diabetikern im Vergleich zur Prävalenz in der Normalbevölkerung, die mit 0,3-3% angegeben werden kann (Seißler et al., 1990). Als Beispiel sei die prospektive Familienstudie der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen in Verbindung mit der Diabetesklinik Bad Oeynhausen angeführt. Sie zeigte, dass 5,5% der Geschwister und 2,5% der Elternteile von Typ I Diabetikern ICA positiv waren. Bei den ICA- positiven Verwandten wurde ein intravenöser Glucose- Toleranz- Test durchgeführt. Dabei zeigten ca. 50% der

Geschwister und nahezu ein Drittel der Eltern eine verminderte Insulinsekretion (Becker et al., 1989).

Gorsuch berichtete über Verwandte von Typ I Diabetikern mit normaler Glucose- Toleranz und positivem ICA- Titer, die später einen zunächst latenten und dann manifesten Diabetes entwickelten (Gorsuch et al., 1981).

Äquivalente Ergebnisse erbrachte die Barts- Windsor- Middlesex- Studie: Verwandte ersten Grades, bei denen ICA- Antikörper nachweisbar waren, entwickelten häufiger einen manifesten Diabetes mellitus als ICA- negative Verwandte (Spencer et al., 1984; Tarn et al., 1988).

Die Familienstudien zeigen, dass die Inselzell- Antikörper bereits vor der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus nachweisbar sind. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nimmt der Titer der Inselzell- Antikörper ab (Mustonen, 1984). Dieser Verlauf entspricht dem zeitlichen Verlauf der Destruktion der Beta- Zellen. Mit dem Zugrundegehen aller Beta- Zellen im Verlauf der Erkrankung nehmen auch die Inselzell- Antikörper ab.

#### *Insulin- Autoantikörper (IAA)*

1983 entdeckte Palmer, dass bei Patienten mit frisch manifestiertem Diabetes mellitus vom Typ I Insulin- Antikörper im Serum auftraten, noch bevor eine Insulin- Therapie begonnen worden war (Palmer et al., 1983). Es mußte sich somit um Autoantikörper gegen das körpereigene Insulin handeln.

Man kann die Insulin- Autoantikörper über einen Radioimmunoassay (Srikanta et al., 1986) oder über einen Enzyme- linked- Immunoabsorbent- Assay (Dean et al., 1986) nachweisen. In Abhängigkeit der verwendeten Nachweismethode schwanken die Prävalenz- Angaben (Atkinson et al., 1986; Dean et al., 1986).

Wie auch die Inselzell- Antikörper sind die Insulin- Autoantikörper in der prädiabetischen Phase nachweisbar und zeigen eine Abnahme des Titers nach der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus (McEvoy et al., 1986).

Interessant ist dabei, dass bei Autoantikörper- Bestimmungen im Kindesalter, IAA die ersten zu messenden Autoantikörper sind (Ziegler et al., 1999).

*Autoantikörper gegen 64kD,*

*Glutaminsäuredecarboxylase (GAD)- Autoantikörper*

Baekkeskov gelang 1982 der Nachweis eines Antikörpers, der sich gegen ein Membranprotein der Beta- Zelle richtete (Baekkeskov et al., 1982). Von diesem Protein kannte man lange nur das Molekulargewicht von 64 Kilo- Dalton (kD). Man sprach daher von dem 64kD- Antikörper.

Seit 1990 weiß man, daß es sich bei dem Protein um Glutaminsäuredecarboxylase handelt (Baekkeskov et al., 1990). Dieses Enzym, das für die Biosynthese des inhibitorisch wirkenden Neurotransmitters Gamma- Amino- Buttersäure (GABA) verantwortlich ist, konnte mit hoher Aktivität in den Beta- Zellen des Pankreas und in bestimmten Zellen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden.

Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation sind die GAD- Antikörper bei Typ I Diabetikern in 80-90% der Fälle nachweisbar.

*Antikörper gegen 38kD- Protein*

Antikörper gegen ein 38kD- Protein der Inselzellen wurden 1982 durch Immunpräzipitation von (35S)- Methionin markierten humanen Inselzellen dargestellt. Diese Antikörper waren bei 20-30% frisch diagnostizierter Typ I Diabetiker und nicht bei gesunden Kontrollpersonen nachweisbar (Baekkeskov et al., 1982).

Das 38kD- Protein ist ein integrales Membranprotein der Insulin- sekretorischen  $\beta$ - Granula der Beta- Zellen mit einem Molekulargewicht von 38kD. Es wird als ein weiteres Autoantigen diskutiert. Es ist bekannt, dass die Insulinabgabe aus den  $\beta$ - Granula auf einen entsprechenden Reiz hin durch Exozytose erfolgt. Im Rahmen dieses Prozesses könnte das Membranprotein Anschluß an die Blutbahn

erlangen und so den immunologischen Prozeß in Gang setzen ( Roep et al., 1990).

#### *IA- 2 (Islet cell Antigen 512) Autoantikörper*

Als weiterer nachweisbarer Autoantikörper ist der IA- 2 Autoantikörper zu nennen. Er richtet sich gegen ein transmembranöses Protein aus der Familie der Protein- Tyrosin- Phosphatasen (Rabin et al., 1994). Dieses Protein wird innerhalb der Membran sekretorischer Granula von neuroendokrinen Zellen, so auch der Insulin- sekretorischen Granula gebildet (Solimena et al., 1996; Wasmeier et al., 1996). Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Typ I Diabetikern spezifische Antikörper gegen IA- 2 nachweisbar sind (Lampasona et al., 1995; Hatfield et al., 1997; Bonifacio et al., 1995; Bingley et al., 1997). Sie waren auch nachweisbar bei Typ I Diabetikern, die zwar für Inselzell- Antikörper, nicht aber für GAD- Antikörper positiv waren (Notkins et al., 1996). Der Nachweis von IA- 2 Antikörpern bei bislang gesunden Personen hat einen hohen prädiktiven Wert bei der Einschätzung des Risikos für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I (Notkins et al., 1996).

#### *Weitere Inselspezifische Autoantikörper*

1988 gelang Kuglin der Nachweis eines Proinsulin- Autoantikörpers, der bei 20% der Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus vor Insulin- Behandlung und bei 6% der Angehörigen nachweisbar war (Kuglin et al., 1988).

Maron wies 1983 bei Typ I Diabetikern vor Insulin- Behandlung IgM- Antikörper gegen Insulin- Rezeptoren nach (Maron et al., 1983).

Ein weiterer Autoantikörper richtet sich gegen das C- Peptid (Kuglin et al., 1989).

### *Bedeutung der Autoantikörper*

Derzeit wird nicht davon ausgegangen, dass die Autoantikörper für die Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes mellitus eine entscheidende Rolle spielen, was im Rahmen folgender Beobachtungen in Bezug auf die Inselzell-Antikörper begründet wird:

1. Die Inselzell - Antikörper richten sich, wie Bottazzo 1978 zeigte, gegen alle Zelltypen der Pankreinseln (Bottazzo et al., 1978). Beim Typ I Diabetes gehen jedoch nur die Beta- Zellen zugrunde.
2. In allen Familienstudien konnten Verwandte ersten Grades mit positivem ICA- Titer nachgewiesen werden, die später keinen Typ I Diabetes entwickelten (Becker et al., 1989; Gorsuch et al., 1981; Spencer et al., 1984; Tarn et al. 1988)
3. Es gibt Fälle der klinischen Manifestation eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus ohne Nachweis von Inselzell- Antikörpern (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989).
4. Die Durchführung einer Plasmapharese konnte bei ICA- positiven Menschen die Manifestation des Typ I Diabetes nicht verhindern (Harrsion et al., 1990).
5. Eine durch Cyclosporin- A- Therapie erzielte Remission des Diabetes war nicht begleitet von dem Verschwinden der ICA- Antikörper aus dem Serum (Mandrup- Poulsen et al., 1990).
6. Im Tiermodell konnte ein Diabetes mellitus Typ I nicht mit Autoantikörpern positiver Seren, sondern nur mittels Zelltransfer übertragen werden (Petersen et al., 1993).

Man geht daher heute davon aus, dass es sich bei dem Auftreten der Autoantikörper im Rahmen des Typ I Diabetes um Sekundärphänomene der Beta- Zelldestruktion handelt.

Die klinische Bedeutung der Bestimmung der Autoantikörper liegt heute vor allem in der Untersuchung Angehöriger von Typ I Diabetikern, um deren Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus vorherzusagen. Dabei werden heute



überwiegend nur die biochemisch nachweisbaren Antikörper IA- 2, GAD- Antikörper und Insulin- Autoantikörper bestimmt. Sie haben zuverlässig die schwierigere Bestimmung der Inselzellantikörper abgelöst (Bingley et al., 1999). Der prädiktive Wert der verschiedenen Antikörper ist sehr unterschiedlich. Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus um so höher ist, je mehr Antikörper nachweisbar sind (Bingley et al., 1994; Gardner et al., 1999).

Eine weitere Bedeutung hat die Bestimmung der Autoantikörper in der Identifizierung des verzögerten Typ I Diabetes im Erwachsenenalter (LADA). Diese Manifestationsform des autoimmunen Diabetes mellitus Typ I, die im mittleren und höheren Erwachsenenalter bei normgewichtigen Personen auftritt, wurde früher meist als Typ II Diabetes verkannt. Zur Differenzierung zum Typ II Diabetes eignet sich die Bestimmung der GAD- und IA- 2- Antikörper, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beim LADA- Diabetes nachweisbar sind (Schrantz et al., 2000). Auch ICA- Antikörper sind beim LADA- Diabetes zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachweisbar (Lohmann et al., 2001). Im weiteren Krankheitsverlauf nimmt die Prävalenz der Autoantikörper auch beim LADA- Diabetes ab (Lohmann et al., 2001). Ähnlich wie beim jugendlichen Typ I Diabetes mellitus steigt bei Verwandten 1. Grades, das Risiko für die Entwicklung eines LADA- Diabetes mit der Anzahl nachweisbarer Autoantikörper (Schernthaner et al., 2001).

#### **1.3.4 Die Rolle der Lymphozyten**

Die histologischen Befunde der Langerhans'schen Inseln zum Zeitpunkt der Insulitis bei Typ I Diabetikern legen den Schluß nahe, dass es sich bei der Zerstörung der Beta- Zelle um einen sequentiellen Prozeß handelt, der durch die Interaktion immunkompetenter Zellen und Beta- Zellen zustande kommt. Zu dieser Fragestellung gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen. Von besonderer Bedeutung sind hier wieder die Tiermodelle der NOD- Maus und der BB- Ratte,

in denen sich die Rolle einzelner Lymphozytenpopulationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten lassen.

Sowohl bei BB- Ratten als auch bei NOD- Mäusen ließ sich durch neonatale Thymektomie die Entwicklung des Diabetes verhindern (Ogawa et al., 1985; Like et al., 1982). Denselben Effekt hatte eine *in vivo* Behandlung von BB- Ratten mit monoklonalen Antikörpern gegen T- Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Like et al., 1986).

Weitere Beweise für die zentrale Rolle der T- Lymphozyten in der Pathogenese lieferten Transferversuche mit NOD- Mäusen. Bendelac transferierte 1987 Milzzellen von diabetischen weiblichen NOD- Mäusen in neugeborene NOD- Mäuse beiderlei Geschlechts und konnte so das vorzeitige Auftreten eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus auslösen. Dies gelang nicht, wenn die Empfänger älter als drei Wochen oder die Spender nicht- diabetisch waren (Bendelac et al., 1987).

Desweiteren geben die Transferversuche Hinweise darauf, dass die pathologischen Prozesse bei der Entwicklung des Diabetes mellitus auf dem Boden eines autoimmunologischen Geschehens ablaufen. So konnten erfolgreiche Transferversuche durchgeführt werden mit T- Zelllinien bzw. - klonen, die eine spezifische Reaktivität gegen vermeintliche Autoantigene aufwiesen. Ein Beispiel dafür ist der erfolgreiche Diabetes- Transfer mittels Inselzell- spezifischer CD4<sup>+</sup> Klone (Haskins et al., 1989; Haskins et al., 1990). Zekzer zeigte, dass der Transfer von GAD- reaktiven CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen bei der NOD- Maus zu Insulitis und Diabetes führt (Zekzer et al., 1998). Äquivalente Ergebnisse wurden von Li Wen erhoben (Wen et al., 1998).

Unklar bleibt die Rolle der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen bei der Diabetes- Entwicklung. Zur Differenzierung, welche dieser Subpopulationen der T- Lymphozyten die pathologischen Prozesse initiieren, wurden weitere Transferversuche bei der NOD- Maus mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen durchgeführt. Bendelac beschrieb, dass für einen erfolgreichen Transfer beide

Subpopulationen erforderlich sind (Bendelac et al., 1987). Andere Autoren berichteten von einem beschleunigten Ausbruch von Insulitis und Diabetes bei NOD- Mäusen durch alleinigen Transfer von  $CD4^+$  Zellen (Christianson et al., 1993; Ablamunits et al., 1999). Wong beschrieb, dass  $CD8^+$  Klone allein einen Diabetes transferieren können (Wong et al., 1996), im Gegensatz dazu ist nach Christianson ein alleiniger Transfer von  $CD8^+$  Zellen nicht erfolgreich (Christianson et al., 1993).

Wang berichtete in diesem Zusammenhang über einen Stamm der NOD- Maus, der keine  $CD8^+$  Zellen bilden kann. Bei diesen NOD- Mäusen kam es weder zur Insulitis noch zur Entwicklung eines Diabetes. Auch NOD- Mäuse, die mit einem Antikörper gegen  $CD8^+$  Zellen behandelt wurden, entwickelten keinen Diabetes (Wang et al., 1996).

Weitere Hinweise für die spezifischen Aufgaben der T- Lymphozytensubpopulationen lieferte die Klonierung von T- Lymphozyten, die aus der Insulitis frisch diabetischer NOD- Mäuse isoliert wurden.

Nagata und Yoon etablierten 1992 sechs  $CD4^+$  und drei  $CD8^+$  T- Zellklone aus der Insulitis von akut diabetischen NOD- Mäusen. Die  $CD4^+$  Zellklone zeigten *in vitro* wohl proliferative, jedoch keinerlei lytische Aktivität gegenüber den Inselzellen. Nur eine enge Anlagerung an die Inselzellen war elektronenmikroskopisch zu beobachten. Demgegenüber zeigten alle  $CD8^+$  Zellklone pseudopodienartige Vorwölbungen selektiv in die Beta- Zellen und zerstörten sie selektiv (Nagata et al., 1992).

Andere Autoren berichteten über  $CD4^+$  T- Zellklone, die protektive Eigenschaften aufweisen. Durch Injektion dieser Klone in NOD- Mäuse vor der Diabetes- Manifestation ließ sich die spontane Entwicklung des Diabetes verhindern. Auch kam es nicht zum Auftreten einer Insulitis (Reich et al., 1989; Boitard et al., 1989).

Im Gegensatz dazu generierte Pankewycz aus der frühen Insulitis von noch nicht diabetischen NOD- Mäusen einen  $CD8^+$  T- Zellklon mit protektiven

Eigenschaften, und einen CD4<sup>+</sup> Klon, der bei Transfer in noch nicht- diabetische NOD- Mäuse den Ausbruch des Diabetes beschleunigte (Pankewycz et al., 1991).

Zusammenfassend kann, zumindest für die Insulitis im Tiermodell, gesagt werden, dass der Ausbruch des Diabetes abhängig zu sein scheint, von den Interaktionen zwischen den verschiedenen Populationen der T- Lymphozyten und dem Ungleichgewicht zwischen potentiell zytotoxischen und immunoregulatorischen T- Lymphozyten in den Infiltraten der Langerhans'schen Inseln. Welche Rolle die einzelnen Zellpopulationen dabei übernehmen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Der Ausgangspunkt scheint eine benigne „Peri- Insulitis“ zu sein, in deren Infiltrat CD4<sup>+</sup> Zellen vom Th2- Phänotyp dominieren. Im weiteren Verlauf kommt es (durch Einwirkung von Interleukin- 12 ?) zu einem Übergang in eine „Intra- Insulitis“, bei der die CD4<sup>+</sup> Zellen einen Th1- Phänotyp aufweisen. Dabei kommt es zur Freisetzung der typischen Th1- Zytokine Interferon-  $\gamma$ , Interleukin- 2 und Tumor- Nekrose- Faktor-  $\beta$ , die an dem Untergang der Beta- Zellen mitwirken. Die ebenfalls nachweisbaren CD8<sup>+</sup> Zellen könnten als Effektoren ebenfalls an der Destruktion der Beta- Zelle beteiligt sein.

Eine wichtige Rolle im Zusammenspiel der verschiedenen Zellpopulationen der Insulitis scheinen die Makrophagen zu spielen, die bei der BB- Ratte die ersten um die Inseln akkumulierenden Zellen sind (Voorbij et al.,1989). Ihre Rolle könnte in der Aufbereitung und Präsentation von Antigenen liegen, oder auch in einer direkten Zerstörung von Beta- Zellen durch Freisetzung von Zytokinen und Radikalen. Der Ausbruch des Diabetes in NOD- Mäusen konnte durch Behandlung mit selektiv für Makrophagen toxischen Silicia Partikeln verhindert werden (Lee et al.,1988; Christianson et al., 1993). Durch Blockade der die

Adhäsion der Makrophagen vermittelnden Rezeptoren mittels Antikörper wurde der Transfer von Diabetes in NOD- Mäuse verhindert (Hutchings et al.,1990).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Der Diabetes mellitus Typ I scheint auf einer immun- medierten Destruktion der Insulin- produzierenden Beta- Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas zu beruhen. An dieser Zerstörung sind T- Lymphozyten maßgeblich beteiligt. Die Strukturen der Beta- Zellen, die für die Lymphozyten als Ziel-Antigen wirken und damit den Autoimmunprozess auslösen, sind bislang nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob ein spezifisches Wachstum humaner Lymphozyten gegenüber diskutierten körpereigenen Autoantigenen nachweisbar ist. Dafür werden Lymphozyten von frisch manifestierten Typ I Diabetikern und ihren Verwandten ersten Grades untersucht und verglichen mit denen gesunder Kontrollpersonen.

Als körpereigene Autoantigene werden unterschiedliche Homogenate aus menschlichen Langerhans'schen Inseln sowie die Fraktion von menschlichen Inseln, die das Membranprotein 64kD enthält, eingesetzt. Tetanus- Toxoid wird bei den Versuchen als Kontrollantigen verwendet.

Nach Kokultivierung der Lymphozyten mit diesen antigenen Strukturen wird in einem anschließend durchgeführten Proliferationsassay untersucht, ob die Lymphozyten der Typ I Diabetiker und die ihrer Verwandten ersten Grades sich bezüglich einer spezifischen Proliferation von denen gesunder Kontrollpersonen unterscheiden.

## 2. Material

### 2.1 Humane Lymphozyten und autologe Seren

Die Lymphozyten und Seren von insgesamt 41 Diabetikern, Verwandten 1. Grades und gesunden Kontrollpersonen wurden verwendet.

Tabelle 1: Typ I Diabetiker und Verwandte 1. Grades

(Legende siehe nächste Seite)

NR.	SEX	ALTER [ Jahre ]	ICA– AK [JDF– Units ]	GAD- AK [Units ]	IAA- AK [Units ]	IA2- AK [Units ]	DIABETES
<b>Verwandte 1. Grades</b>							
1	m	21	neg.	90 (++)	Ø	neg.	nein
2	m	24	neg.	neg.	Ø	63 (++)	nein
3	m	54	neg.	neg.	Ø	neg.	nein
4	m	26	neg.	neg.	Ø	neg.	nein
5	w	43	neg.	neg.	neg.	neg.	nein
6	w	53	5 (gw)	3 (+)	Ø	neg.	nein
7	w	28	10 (+)	Ø	neg.	Ø	nein
<b>Frisch manifestierte Typ I Diabetiker</b>							
8	w	53	20 (+)	Ø	neg.	Ø	ja
9	m	34	80 (++)	60 (++)	neg.	23 (+)	ja
10	w	43	20 (+)	6 (+)	neg.	neg.	ja
11	m	24	160 (++)	neg.	neg.	24 (+)	ja
12	m	14	80 (++)	Ø	1380 (++)	Ø	ja
13	m	21	10 (+)	Ø	neg.	Ø	ja
14	w	27	10 (+)	Ø	Ø	Ø	ja
15	m	21	40 (++)	Ø	neg.	Ø	ja
16	w	19	10 (+)	neg.	neg.	neg.	ja
17	m	22	10 (+)	Ø	neg.	Ø	ja
18	m	25	5 (gw)	Ø	neg.	Ø	ja
19	w	37	5 (gw)	neg.	neg.	neg.	ja
20	m	28	neg.	20 (+)	Ø	neg.	ja
21	m	25	neg.	47 (++)	neg.	neg.	ja
22	m	39	neg.	54 (++)	neg.	neg.	ja
23	m	44	neg.	Ø	Ø	Ø	ja
24	w	35	neg.	2 (+)	neg.	neg.	ja

Legende:	Sex:	Geschlecht	neg.	negativ
	w:	weiblich	(+)	positiv
	m:	männlich	(++)	Stark positiv
	Ø	nicht bestimmt	(gw)	grenzwertig

Tabelle 2: Kontrollpersonen

<b>FALL – NR.</b>	<b>GESCHLECHT</b>	<b>ALTER [ a ]</b>	<b>ICA – TITER [JDF – Units ]</b>	<b>DIABETES</b>
<b>Kontrollpersonen</b>				
25	weiblich	26	negativ	nein
26	männlich	24	negativ	nein
27	weiblich	27	negativ	nein
28	weiblich	25	negativ	nein
29	weiblich	30	negativ	nein
30	männlich	26	negativ	nein
31	weiblich	24	negativ	nein
32	männlich	25	negativ	nein
33	weiblich	25	negativ	nein
34	weiblich	28	negativ	nein
35	männlich	27	negativ	nein
36	männlich	56	negativ	nein
37	weiblich	53	negativ	nein
38	weiblich	22	negativ	nein
39	weiblich	26	negativ	nein
40	männlich	28	negativ	nein
41	männlich	28	negativ	nein

Alle getesteten Personen waren kaukasischen Ursprungs. Die Typ I Diabetiker wurden an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus- Liebig- Universität Gießen betreut. Es wurden 17 frisch manifestierte Typ I Diabetiker untersucht, wobei die Blutentnahme innerhalb der ersten zwei Wochen nach Manifestation und vor der ersten Insulingabe erfolgte.

Weiterhin wurden sieben Verwandte 1.Grades von Typ I Diabetikern untersucht. Die 17 Kontrollpersonen stammten alle aus dem Umfeld von Gießen. Sie wiesen keinen Typ I Diabetiker in der Familie auf, und hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Zeichen einer Infektion.

Die ICA-Titerbestimmungen erfolgten im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen durch eine indirekte Immunfluoreszenz auf unfixiertem, frisch gefrorenem Pankreas der Blutgruppe Null. Die Titer sind angegeben in JDF-Units. Je nach Verfügbarkeit von Serum, welches eingefroren worden war, erfolgten z.T. später Nachbestimmungen von GAD-, IAA- und IA- 2 Antikörper.

Alle untersuchten Personen waren mit der Blutentnahme und der Verwendung ihrer Zellen im Rahmen einer Dissertation einverstanden.

## **2.2 Geräte**

Instrumente und Verbrauchsartikel waren autoklavierbar bzw. lagen in steriler Form vor, soweit sie für Zellkulturen verwendet wurden.

Autoklav, Fa. Webeco, D- Bad Schwartau

Bechergläser, Fa. B. Braun, D- Melsungen

Brutschrank, Typ B 5060 EC - CO<sub>2</sub>, Fa. Heraeus, D- Hanau

Bunsenbrenner Touch-o-Matic

Eppendorfhütchen, Fa. Eppendorf, D- Köln

Filteraufsätze :

- Filteraufsätze für Einmalspritzen, Porengröße 0,45 µm, Fa. Schleicher & Schuell, D- Dassel
- Bottle Top Filter, Porengröße 0,45 µm, Fa. Falcon, D- Gräfelfing- Lochham

Gamma - Counter MR 252, Fa. Kontron, D- München



#### Gefrierschränke :

- handelsüblicher Tiefgefrierschrank (- 20 °C), Fa. Bosch,  
D- Stuttgart
- -80°C - Gefrierschrank, Fa. Bosch, D- Stuttgart

Glaskolben und Rührstab (Potter), Fa. B.Braun, D- Melsungen

Kanülen, 18G, 21G, Fa. B. Braun, D- Melsungen

Kühlschrank, handelsüblicher Kühlschrank, 4°C, Fa. Bosch,  
D- Stuttgart

#### Kulturgefäße :

- Gewebekulturplatte 24 - Loch, mit Deckel, Fa. Costar, A- Wien (über Szabo- Scandic HandelsgmbH & CoKG)
- Gewebekulturplatte 96 - Loch, U - Form, mit Deckel, Fa. Costar, A- Wien (über Szabo- Scandic HandelsgmbH & CoKG)

Mikropipettierhilfe, Fa. Hirsch

#### Mikroskope :

- Invertmikroskop, Fa. Olympus, D- Hamburg
- Lichtmikroskop, Fa. Leitz, D- Stuttgart
- Fluoreszenzmikroskop, Fa. Olympus, D- Hamburg

Neubauer - Zählkammer, Fa. Neubauer, D- Nürnberg

#### Pipetten ( einzeln steril verpackt ) :

- Auslaufpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, Fa. Sarstedt, D- Hamburg
- Transferpipetten ( Pasteurpipetten ), 3,5 ml, Fa. Sarstedt, D- Hamburg
- Eppendorfpipetten, variabel 10 - 100 µl, 100- 1000 µl,  
Fa. Eppendorf, D- Köln

#### Pipettenspitzen :

- gelb, autoklavierbar, Aufnahmevolumen 1-100 µl, Fa. Sarstedt, D- Hamburg
- blau, autoklavierbar, Aufnahmevolumen 101-1000 µl, Fa. Sarstedt,  
D- Hamburg
- Combitips, 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, Fa. Eppendorf, D - Köln

Pipettierhilfe Pipettus Standard, Fa. Hirsch

Röhrchen mit Schraubverschluß :

- 50 ml, Fa. Greiner BioChemica, D- Flacht
- 12 ml, Fa. Greiner BioChemica, D- Flacht
- Kryo - Röhrchen 1,0 ml, 4,5 ml, Fa. Nunc

Schüttler, Fa. Keutz, D- Reiskirchen

Spritzen :handelsübliche sterile Einmalspritzen, Fa. B.Braun,

D- Melsungen:

- 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Volumina

Sterilwerkbank Microflow, Fa. Stolco

Ultraschall - Homogenisator, Fa. Sartorius, D- Göttingen

Vortexer Reax 2000, Fa. Heidolph Instruments, D- Schwabach

Waage ( digitale Feinwaage ), Fa. Sartorius, D- Göttingen

Wasserbad, Fa. Kottermann, D- Hänigsen

Zentrifugen :

- Kühlzentrifuge J - 6B, Fa. Beckmann, D- München
- Hettich Universal Tischzentrifuge, Fa. HettichLab, D- Tuttlingen
- Ultrazentrifuge, Fa. Beckmann, D- München

Zellerntegerät, halbautomatisch

## **2.3 Reagenzien**

Reagenzien und Lösungen lagen in steriler Form vor, soweit sie für Zellkulturen verwendet wurden.

Aqua ad injectabile 1000 ml, Fa. B.Braun, D - Melsungen

Analytic Aquasafe 300 plus, Fa. Zinsser

Äthanol 80 %ig, Fa. Hoechst / Aventis, F- Straßburg

Dimethylsulfoxid DMSO, Fa. Biochrom KG, D- Berlin

EDTA, Fa. Serva, D- Heidelberg  
 Eosin, Fa. Merck, D- Darmstadt  
 Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, auf Viren und  
     Mykoplasmen untersucht, Fa. Gibco, D- Karlsruhe  
 Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Fa. Bio- RAD, D- München  
 Glycerin, Fa. Merck, D- Darmstadt  
 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) 10 x, ohne  $\text{NaHCO}_3$ ,  
     Fa. Gibco, D- Karlsruhe  
 Kochsalzlösung, 0,9%, isoton, Fa. B.Braun, D- Melsungen  
 Lymphocult T - LF, lektinfrei, Fa. Biotest, D- Dreieich  
     Chargen: 111023/111024/111033/111035/111045/  
     111122/112062/112073/112092  
 Lymphoprep, 1,077 Dichte, Fa. Nycomed / Amersham, UK- Buckinghamshire  
 Natriumhydrogencarbonat, Fa. Gibco, D- Karlsruhe  
 PBS, Phosphat-Puffer-Konzentrat pH 7,4 $\pm$ 0,1,  
     Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, D- Lich  
 Phytohämagglutinin L, lymphozytenstimulierend, Fa. Biochrom  
 PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Fa. Sigma, D- Deisenhofen  
 Protein- A- Sepharose CL 4 B, Pharmacia LKB, D- Freiburg  
 Pyridoxal- 5- Phosphat, Fa. Sigma, D- Deisenhofen  
 S- 35- Methionin, Fa. Amersham / Nycomed, UK- Birminghamshire  
 Tetanol, Tetanus - Adsorbat - Impfstoff, 75 IE / 0,5 ml,  
     Zusammensetzung : Tetanus- Adsorbat- Impfstoff (75I.E.),  
     Aluminiumhydroxid (1,5mg) als Adjuvans, Natriumtimerfonat (0,025mg)  
     als Konservierungsmittel, Formaldehyd (<0,001mg)  
     Behring / Aventis, D- Marburg  
 [6-  $^3\text{H}$ ] Thymidin, spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol, Fa. Amersham/  
     Nycomed, UK- Birminghamshire;  
 Trasylol (Aprotinin), Fa. Gibco, D- Karlsruhe

Tris, Fa. BIO-RAD, D- München

Triton- X- 100, Fa.Merck, D- Darmstadt

Vetren 200 (200 IE Heparin- Natrium), Promonta

Zellkulturmedium :

- Iscove´s Modifiziertes Dulbecco´s Medium, Gibco, D- Karlsruhe

## **2.4 Lösungen und Medien**

Die Lösungen und Zellkulturmedien sind nach Versuchsansätzen geordnet.

### **2.4.1 Gewinnung peripherer, humaner Lymphozyten**

*Hank`s Lösung :*

900 ml Aqua ad injectabile werden mit 100 ml Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) vermengt. Die Lösung kann im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

*Zellkulturmedium : Iscove´s Modifiziertes Dulbecco´s Medium (IMDM) :*

Das Pulvermedium IMDM wird bei Raumtemperatur vorsichtig in 950 ml Aqua ad injectabile gelöst. Es werden 3,024 g Natriumbicarbonat hinzugefügt.

Anschließend wird das Medium über Bottle Top Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und steril in autoklavierte 100ml-Glasflaschen überführt.

Das Medium wird bei 4 ° C gelagert.

Zur Kultivierung der Lymphozyten wird dem Medium 10% Humanserum zugefügt. Das Humanserum wurde einem gebildetem Serumpool entnommen (siehe Methoden) und zuvor hitzeinaktiviert.

## **2.4.2 Auszählung und Überprüfung der Vitalität der gewonnenen Lymphozyten**

*Eosin- Lösung :*

1 g Eosin- Trockenpulver werden in 99 ml Aqua dest. gelöst.

## **2.4.3 Isolierung der 64kD- Fraktion aus humanen Inselzellen**

*Tris- Puffer (pH 7,4)*

Für den Tris- Puffer wird folgender Ansatz durchgeführt :

- 20 mM Tris
- 10% Trasylol
- 2mM EDTA
- 0,2 mM Pyridoxal-5-Phosphat
- 2 mM PMSF
- 150 mM NaCl

*Lyse- Puffer (pH 7,4)*

Der Ansatz erfolgt wie aufgeführt :

- 20 mM Tris
- 10% Trasylol
- 2 mM EDTA
- 0,2 mM Pyridoxal-5-Phosphat
- 2 mM PMSF

#### *Triton- Puffer (pH 7,4)*

Folgender Ansatz wird durchgeführt :

- 20 mM Tris
- 10% Trasytol
- 2 mM EDTA
- 0,2 mM Pyridoxal-5-Phosphat
- 2 mM PMSF
- 150 mM NaCl
- 1% Triton-X-100

#### *Protein-A- Sepharose (PAS) Aufbereitung :*

Pro 15000 Inseln werden 4 ml PAS benötigt. Die notwendige Menge wird in 30 ml PBS- Puffer gelöst und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Das erhaltene Pellet wird in 4 ml PBS- Puffer resuspendiert, und bis zum Einsatz bei 4°C gelagert.

### **2.4.4 Herstellung der Antigen- und Lektin- Lösungen**

#### *Tetanol- Lösungen*

Als Stammlösung wird handelsüblicher Tetanol- Impfstoff der Firma Behring verwendet. Diese Lösung, entsprechend 100% Tetanol, wird mit komplettem Medium auf Konzentrationen von 1% und 1,5% Tetanol verdünnt, und in Portionen von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert. Die Einfrierampullen werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### *Phytohämagglutinin (PHA)- Lösung*

Es wird das PHA- Trockenpulver (1,2 mg) in 5 ml Aqua destillata gelöst. Diese Stammlösung mit 240 µg PHA pro ml Lösung wird mit komplettem Medium auf eine Konzentration von 2 µg PHA pro ml Lösung verdünnt, und in Volumina von 0,5 ml, 2 ml und 4 ml in Einfrierampullen portioniert. Die Einfrierampullen werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

## 3 Methoden

### 3.1 Isolierung humaner, peripherer Lymphozyten

Die Isolierung der peripheren Lymphozyten aus Vollblut erfolgt nach der Methode von Boyum (Boyum, 1976).

Durch Punktion einer peripheren Vene werden 20 ml Vollblut steril gewonnen. Zur Hemmung der Blutgerinnung wird das Blut mit 1 ml Vetren (100 I.E. Heparin) versetzt.

Das heparinisierte Vollblut wird im Verhältnis 1:1 mit Hank's Lösung in einem sterilem Zentrifugenröhrchen vermischt.

Jeweils 20 ml dieses Blut- Hank's Gemisches werden vorsichtig auf 20 ml Lymphoprep in zwei weiteren Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet, wobei eine Durchmischung der beiden Phasen vermieden wird.

Im Anschluß daran wird bei 1000 x g für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte beider Phasen kommt es durch die Zentrifugation zur Anreicherung der Lymphozyten in der Interphase, die in Form einer weißen Scheibe zwischen Trennlösung und Plasma liegt.

Im Bodensatz befinden sich Erythrozyten und Granulozyten.

Die Lymphozyten werden mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.



Abb.1:

Schichten der Blutkomponenten nach Dichtegradientenzentrifugation



Da die Lymphozyten- Lösung noch Gradienten- und Thrombozyten- Beimengung enthält, erfolgen zur weiteren Reinigung zwei Waschvorgänge in Hank's Lösung bei 400 x g bzw. 300 x g für jeweils 10 Minuten.

Die Lymphozyten befinden sich anschließend als Pellet am Boden, die Thrombozyten und das Lymphoprep im Überstand, der verworfen wird.

Das lymphozytenreiche Pellet wird in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und mittels Vortexer vermischt. Anschließend wird die Zell- Konzentration durch Auszählung in der Neubauer- Kammer bestimmt.

### **3.2 Auszählung und Überprüfung der Vitalität der gewonnenen Lymphozyten**

Der gut durchmischten Lymphozytensuspension werden steril 20 µl entnommen und mit 40 µl Eosin- Lösung versetzt, sodass eine 3- fache Verdünnung entsteht. Nach gründlicher Durchmischung wird mit dieser Lösung eine Neubauer- Zählkammer gefüllt. Die vier Felder mit einem Gesamtvolumen von 0,4 µl werden meanderförmig unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Anzahl der gezählten Zellen entspricht der Zellzahl in 0,4 µl Zell- Eosin- Lösung. Durch Multiplikation mit dem Faktor 2,5 erhält man die Zellzahl in 1 µl Zell- Eosin- Lösung. Durch Multiplikation mit dem Faktor 1000 erreicht man eine Umrechnung auf 1 ml.

Die errechnete Zahl wird mit dem Faktor 3, entsprechend der Verdünnung mit Eosin- Lösung, und mit dem Faktor 10, entsprechend der Resuspension der Lymphozyten in 10 ml Kulturmedium, multipliziert.

Der errechnete Wert gibt die Zellzahl der isolierten Lymphozyten an.

Mit Hilfe der Eosin- Lösung kann weiterhin die Vitalität der isolierten Lymphozyten überprüft werden. Der Farbstoff Eosin durchdringt nur die

defekten Zellmembranen. Dagegen kann er die intakte Zellmembran nicht passieren. Avitale Zellen färben sich daher rot an. Weiterverarbeitet werden nur Zellsuspensionen mit mindestens 98% vitalen Zellen.

### **3.3 ICA- Bestimmung (Testprinzip)**

Inselzellantikörper wurden im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universitätsklinik Gießen bestimmt. Dafür wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest auf Kryoschnitten von menschlichem Pankreasgewebe der Blutgruppe 0 durchgeführt, wobei keine Fixierung verwendet wurde (Becker et al., 1988; Becker et al., 1989). Die Inkubationszeit mit 25 µl Serum der zu untersuchenden Probanden betrug 75 Minuten. Nach dem Waschen mit PBS- Puffer folgte eine Inkubation für 45 Minuten mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- markiertem Antiserum gegen humanes IgG, welches mit PBS- Puffer 20fach verdünnt worden war. Nach erneutem Waschen mit PBS- Puffer wurden die Schnitte mit einem Glycerin / PBS- Puffer- Gemisch in einem Verhältnis von 1 : 3 eingedeckelt und am selben Tag von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Probenidentität unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Die Höhe der ICA- Titer wurde mit Hilfe des offiziellen JDF (Juvenile Diabetes Foundation) Standardserums in JDF- Einheiten ausgedrückt. Das Detektionslimit liegt bei 5 JDF- Einheiten.

Dieser Assay wird in regelmäßigen Abständen in proficiency Tests evaluiert. Die Spezifität liegt bei 100%, die Sensitivität bei 92%.

### **3.4 Gewinnung von Humanserum**

Mittels Venenpunktion werden von dem jeweiligem Spender 100 ml humanes Vollblut gewonnen, das nach 15 Minuten, nach Ablauf der vollständigen Gerinnung, bei 2500 x g für 10 Minuten zentrifugiert wird.

Nach der Zentrifugation haben sich die korpuskulären Bestandteile des Blutes als Bodensatz abgesetzt, während man das Serum als den Überstand sammeln kann.

### **3.5 Herstellung eines Serumpools**

Als Spender werden männliche Personen im Alter von 20 bis 40 Jahren mit den folgenden Voraussetzungen ausgewählt :

- keine Bluttransfusionen in der Eigenanamnese
- keine Organtransplantation in der Eigenanamnese
- keine aktuell bestehenden Infektionen
- keine Erkrankung an Typ I Diabetes
- Keine Typ I Diabetiker in der Familienanamnese
- kein nachweisbarer ICA- Titer

Von neun Spendern wird Humanserum auf die oben beschriebene Art gewonnen.

Von dem Serum eines jeden Spenders wird eine Probe zur Bestimmung von ICA- Antikörpern abgenommen. Nur ICA- negatives Serum wird weiter verwendet.

Das Serum wird zur Inaktivierung von Komplement für 30 Minuten in ein Wasserbad mit 56°C Temperatur gegeben.

Von jeweils 3 Spendern werden Serumproben miteinander vermischt und mittels einer gemischten Lymphozytenkultur auf Zytotoxizität untersucht. Im Anschluß daran können die unbedenklichen Seren vollständig miteinander vermischt, in Einfrierampullen portioniert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

Alle geschilderten Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.6 Die gemischte Lymphozytenkultur zur Überprüfung des gesammelten Serums auf Zytotoxizität**

In der gemischten Lymphozytenkultur werden Lymphozyten mit allogenen Lymphozyten als Stimulus kultiviert. Dabei werden die zur Stimulation verwendeten Zellen durch Bestrahlung reaktionsunfähig gemacht. Infolge von Differenzen zwischen den HLA- Antigenen kommt es zu einer Proliferation der unbestrahlten Lymphozyten.

Diese gemischte Lymphozytenkultur wird in 3 verschiedenen Ansätzen durchgeführt :

- a) in reinem Kulturmedium
- b) in Kulturmedium mit Zusatz von fetalem Kälberserum
- c) in Kulturmedium mit Zusatz von dreifach gepooltem Humanserum.

Durch den Vergleich der Proliferationen der Lymphozyten in den verschiedenen Medien kann der Einfluß des Serums auf das Wachstum der Lymphozyten überprüft werden. Ein zytotoxisches Serum kann so identifiziert werden.

Zur Durchführung werden von drei zufällig ausgewählten Spendern Lymphozyten isoliert und auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Jeweils die Hälfte der Zellen eines jeden Spenders wird mit 30 Gray bestrahlt (Kobalt- 60- Quelle); sie dienen als Stimulator-Zellen. Die nicht

bestrahlten Zellen dienen als Responder- Zellen.

Es werden jeweils 50.000

Responder- Zellen eines Spenders in 50  $\mu$ l Medium

ohne Serum- Zusatz mit

Stimulator- Zellen eines

anderen Spenders in gleicher Konzentration kokultiviert.

Dem Ansatz werden 100  $\mu$ l

Medium zugegeben, in

dem das gepoolte

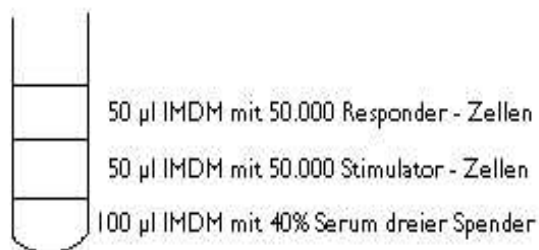


Abb.2: Ansatz der gemischten Lymphozytenkultur

Humanserum enthalten ist. Die Endkonzentration des Serums beträgt 20%.

In gleicher Weise erfolgen Ansätze unter Verwendung von fetalem Kälberserum (ebenfalls in einer Endkonzentration von 20%) sowie ohne Zusatz von Serum.

Zur Kontrolle der Effektivität der Bestrahlung werden Stimulatorzellen aller Spender ohne Zusatz von Responderzellen miteinander kultiviert.

Die Kultivierung erfolgt in einer 96- Lochplatte, jeweils in Triplets.

Die Ansätze werden im Brutschrank bei 37°C , 95% Luft- 5% CO<sub>2</sub>- Gemisch für fünf Tage kultiviert.

Sechzehn Stunden vor Ablauf der Kulturzeit werden die Ansätze mit 1  $\mu$ Ci 3H- Thymidin pro Loch markiert.

Die Zellen werden nach Ablauf der Kulturzeit mit einem halbautomatischen Zellerntegerät geerntet, und die Proben in einem Flüssig- Szintillations- Counter gemessen. Die dabei von den Zellen inkorporierte Radioaktivität, gemessen in

counts per minute (cpm), stellt die Größe für die Proliferationsaktivität der Zellen dar.

Alle Schritte werden unter Beachtung der Sterilität durchgeführt.

### **3.7 Kryokonservierung von Lymphozyten in einem Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltigen Medium**

Nach der Isolation der Lymphozyten werden diese resuspendiert in IMDM-Medium mit 30% gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum unter Einstellung einer Zellzahl von  $10 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter. Diese Zellsuspension wird für 30 Minuten auf Eis gekühlt.

Nach Ablauf der Kühlung wird zu der Zellsuspension in gleichem Volumen das Dimethylsulfoxid-Medium (IMDM mit 20% DMSO und 30% gepooltes Humanserum) bei 4°C Tropfen für Tropfen hinzugefügt. Dafür werden auf Eis jeweils 500 µl Zellsuspension in die Einfrierampullen überführt und tröpfchenweise 500 µl des DMSO-Mediums hinzugegeben.

Dementsprechend erhält man in den Einfrierampullen ein Volumen von 1 ml mit  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Medium mit 10% DMSO und 30% Humanserum.

Es erfolgt die sofortige Lagerung bei -70°C.

Am vierten Tag erfolgt die Umlagerung der Ampullen in flüssigen Stickstoff.

### **3.8 Auftauvorgang der Lymphozyten nach der Kryokonservierung**

Die Einfrierampullen werden unter fließendem Wasser mit einer Temperatur von ungefähr 37°C bewegt, bis fast das gesamte Eis geschmolzen ist.

Der Ampullen-Inhalt wird anschließend sofort in 10 ml IMDM mit 30% gepooltem, hitzeinaktiviertem Humanserum überführt und für 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 10 ml Medium gleicher Zusammensetzung wie oben resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension der Zellen im Medium wird eine Probe der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Anschließend erfolgt eine zweite Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 x g.

Nach dieser Zentrifugation stehen die Zellen, die im Pellet enthalten sind, zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

### **3.9 Homogenisierung humaner Inselzellen**

Die humanen Pankreas- Inselzellen wurden freundlicherweise von der Inseltransplantationsgruppe der Medizinische Klinik III und Poliklinik der Universitätsklinik Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Bretzel zur Verfügung gestellt. Sie wurden nach der Methode von Ricordi isoliert (Ricordi et al., 1988). Als Spendermaterial dienten Pankreata von verstorbenen Organspendern.

Bis zu ihrer Verarbeitung werden die Inselzellen in CMRL 1066- Medium mit 1% HEPES und 10% Humanserum im Brutschrank bei 37°C in einem 95% Luft- 5% CO<sub>2</sub> - Gemisch gelagert. Die Anzahl der vorliegenden Inselzellen ist ungefähr bekannt.

Zur Entfernung des Mediums wird die Inselzellsuspension für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes werden pro 500 Inseln 1 ml IMDM mit 30 % gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum (komplettes IMDM) zum Pellet zugegeben. Das Pellet wird gründlich im Medium resuspendiert.

Jeweils 1 ml der Inselzellsuspension wird im Glaskolben mittels Potterstab für je 10-15 Sekunden fünfmal mit niedrigster Umdrehungszahl zerkleinert. Dieser Vorgang wird mit der höheren Umdrehungszahl wiederholt.

Anschließend wird die homogenisierte Zellsuspension in eine Vertiefung einer 24- Lochplatte überführt und unter dem Lichtmikroskop wird das Ergebnis der Homogenisierung betrachtet. Gegebenenfalls wird die Homogenisierung wiederholt.

Nach der vollständigen Zerkleinerung der gesamten Inselzellsuspension wird diese in einem 50 ml Nunc- Zentrifugenröhrchen gesammelt und gründlich resuspendiert.

Anschließend wird die Suspension in Einfrierampullen in einem Volumen von 1 ml mit dem Homogenat aus 500 humanen Pankreas- Inseln portioniert. Durch Verdünnung mit Kulturmedium werden Portionen mit Homogenat aus 100 Inseln pro ml hergestellt und in Volumina von je 0,5 ml in Einfrierampullen überführt.

Die Einfrierampullen werden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.10 Ultraschall- Homogenisierung humaner Inselzellen**

Auf die gleiche Weise wie bei der Homogenisierung der humanen Inselzellen werden diese mit einem Ultraschall- Homogenisator zerkleinert. Dabei wird bei 50 Watt in Intervallen von 1 Sekunde der Ultraschall für insgesamt eine Minute eingesetzt. Die Portionierung erfolgt ebenfalls wie oben für die Homogenisierung beschrieben.



### **3.11 Isolation der 64kD- Fraktion aus humanen Inselzellen**

Die Methodik beruht auf der Immunpräzipitationsmethode nach Christie (Christie et al., 1990) bzw. deren Modifikation von Seissler (Seissler et al., 1992).

Die frischen humanen Inselzellen werden für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, um sie von dem Medium, in dem sie nach der Isolation resuspendiert waren, zu trennen. Die im Pellet zurückbleibenden Inselzellen werden nun in

30 ml Tris- Puffer resuspendiert und nochmals für 10 Minuten bei 100 x zentrifugiert, sodass im Pellet (der Überstand wird verworfen) gereinigte Inselzellen vorliegen.

#### *Zell- Lyse*

Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C, einschließlich Vorkühlung der Zentrifugen.

Die im Pellet vorliegenden gereinigten Inselzellen werden in 4 ml Lyse- Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis gelagert. Es folgt eine Homogenisierung mit Ultraschall für insgesamt eine Minute bei 50 Watt in Intervallen von einer Sekunde. Das so gewonnene Inselzell- Lysat wird für 30 Minuten bei 4°C in einer Ultrazentrifuge mit 36.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet enthält gereinigtes Inselzell- Lysat.

Zur Proteinextraktion wird das Pellet in 4 ml Triton- Puffer resuspendiert, die Lösung wird anschließend für 2 Stunden auf Eis gelagert und regelmäßig resuspendiert.

In einem nächsten Schritt wird die erhaltene Lösung aus Insezell- Lysat und Triton- Puffer bei 4°C für 30 Minuten in einer Ultrazentrifuge mit 16.000 x g zentrifugiert. Dadurch kommt es zur Sedimentation von ungelösten Membranproteinen, die als Pellet verworfen werden.

### *Immunpräzipitation*

Der verbliebene Überstand, der Inselzellproteine einschließlich des 64kD-Antigens enthält, wird in identischen Volumina auf einzelne Eppendorf- Cups verteilt. Es wird humanes Serum im Verhältnis 1 : 4 zum Inhaltsvolumen zugegeben. Dabei handelt es sich um Serum eines gesunden, ICA-, IAA- und GAD- Antikörper- negativen und HLA- typisierten Probanden. Die Eppendorf- Cups werden jetzt bei 4°C für drei Stunden auf einem Schüttler gelagert.

Nach Ablauf der drei Stunden wird aufbereitete Protein-A- Sepharose (PAS) im Verhältnis von 1 : 1 zu dem vor der Serum- Zugabe bestandenen Inhaltsvolumen zugegeben.

Die Eppendorf- Cups werden nun für eine Stunde bei 4°C auf einem Schüttler gelagert, und anschließend für fünf Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert.

Durch diese Zentrifugation kommt es zur Sedimentation von PAS und eventuell daran gekoppelten Antigen- Antikörper- Komplexen.

Die Überstände werden gesammelt und mit komplettem Medium so verdünnt, dass 1 ml Medium die Fraktionen aus 200 humanen Inseln enthält. Diese Lösung wird portioniert und bis zum Gebrauch in der Zellkultur bei -20°C eingefroren.

Nach der gleichen Methodik wurde im Immunologischen Labor der medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Gießen aus radioaktiv markiertem Inselhomogenat die 64kD- Fraktion isoliert und mit GAD- Antikörper- haltigem Humanserum inkubiert. Die entstandenen

immunpräzipitierten Proteine wurden ihrem Molekulargewicht entsprechend durch SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese aufgetrennt, angefärbt und autoradiographisch nachgewiesen. Eine Bande bei einem Molekulargewicht von 64kD entsprach dem radioaktiv markierten 64kD- Antigen (und erlaubte Rückschlüsse auf das Vorhandensein von GAD- Antikörpern im Serum des untersuchten Probanden). Daraus kann geschlossen werden, dass die isolierte Fraktion der humanen Inselzellen tatsächlich das 64 kD- Antigen enthält.

Zusätzlich wurden parallel dazu, als Kontrolle, die untersuchten Seren in einem quantitativem Immunpräzipitations- Radioligandentest nach der Methode von Petersen (Petersen et al., 1994) auf Antikörper gegen rekombinante menschliche Glutamat- Decarboxylase vom Hagedorn Research Institute in Gentofte, Dänemark untersucht.

Der Vergleich der beiden Methoden zum Nachweis von GAD- Antikörpern lieferte in 85% der Seren ein übereinstimmendes Ergebnis.

### **3.12 Bildung antigen- spezifischer T- Zelllinien**

Die Methodik zur Bildung antigen- spezifischer T- Zelllinien beruht auf Versuchen der Arbeitsgruppe um Dr. Bart. O. Roep der Abteilung Immunohämatologie und Bluttransfusionen des University Medical Centre in Leiden in den Niederlanden, wo ich mehrere Tage hospitierte.

Nach der Isolation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Probanden werden diese unter Einstellung einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  /ml in IMDM mit 10% gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum (komplettes IMDM) resuspendiert.

In einer 24- Lochplatte werden pro Vertiefung  $10^6$  dieser Zellen in 1 ml komplettem IMDM kokultiviert mit jeweils einem der in der folgenden Tabelle angegebenen Antigene.

Tabelle 3 : Zur Bildung von Zelllinien verwendete Antigene

	Antigen	Konzentration pro Vertiefung
1	Inselzellhomogenat	aus 500 Inseln
2	Ultraschallhomogenat	aus 500 Inseln
3	64kD- Fraktion	aus 200 Inseln

Alle Antigene sind jeweils in 1 ml komplettem Medium gelöst. Als Positiv-Kontrolle wird Tetanol eingesetzt. Dabei werden  $1 \times 10^6$  Lymphozyten in 1 ml komplettem IMDM mit 1 ml 1%- igem Tetanol kokultiviert, so daß das Tetanol in einer Endkonzentration von 0,5% pro Vertiefung der 24- Lochplatte vorliegt.

Als Negativ- Kontrolle dient ein Ansatz von  $1 \times 10^6$  peripheren Lymphozyten in komplettem Medium ohne Antigenzusatz.

Die Ansätze erfolgen jeweils in Dupletts.

Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  in einem 95%Luft-5%CO<sub>2</sub>- Gemisch.

Am Tag 4 werden aus jeder Vertiefung vorsichtig von der Oberfläche her jeweils 1 ml Kulturmedium entnommen und ersetzt durch 1 ml komplettes IMDM, angereichert mit 40% Lymphocult- T als Quelle für Interleukin- 2.

Das Zellwachstum wird täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und jeden zweiten Tag werden erneut jeweils 1 ml Medium ersetzt durch komplettes IMDM, angereichert mit 20% Lymphocult- T.

Bei Vollwachsen der Vertiefungen bzw. bei Umschlag des Farbindikators des IMDM als Zeichen für ein Anfallen von zu vielen sauren

Stoffwechselprodukten, wird der Inhalt einer Vertiefung auf zwei Vertiefungen aufgeteilt, und wie oben geschildert weiterbehandelt.

Auf diese Weise erfolgt die Kultivierung der Zellen mit 5- 7 maliger Zugabe von Interleukin- 2.

Hierdurch werden, ausgehend von den peripheren Lymphozyten der Testpersonen und der gesunden Kontrollpersonen, Zelllinien auf die verschiedenen o.g. Antigene gebildet.

Sie werden gesammelt und stehen jetzt für den Test auf Antigen- spezifische Proliferation zur Verfügung.

### **3.13 Zweiter Stimulationszyklus**

In einem zweiten Stimulationszyklus wird versucht, durch eine erneute Stimulation der gebildeten Zelllinien eine spezifischere Reaktion zu erzielen. Dafür wurden die Zellen nach der Zellliniengeneration gesammelt und nach Auzählung auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  in IMDM mit 10% gepooltem und hitzeinaktiviertem Humanserum (komplettes IMDM) resuspendiert.

In einer 24- Lochplatte werden pro Vertiefung  $10^6$  dieser Zellen in 1 ml komplettem Medium kokultiviert mit dem jeweiligen Antigen, welches zur primären Generation der Zelllinienbildung verwandt wurde. Auch hier erfolgt der Ansatz wieder in Duplets. Die weitere Kultivierung und Zugabe von Lymphocult- T als Quelle für Interleukin- 2 erfolgt äquivalent zum Versuchsaufbau bei der primären Zellliniengeneration. Als Negativ- Kontrolle wurde die Proliferation der Zellen ohne Antigen- Zusatz untersucht.

### **3.14 Antigen- spezifische Proliferation von T- Zelllinien**

Die Testung einer antigen- spezifischen Proliferation von T- Zelllinien erfolgt ebenfalls in Anlehnung an Versuche der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Bart. O. Roep der Abteilung Immunohämatologie und Bluttransfusionen des University Medical Centre in Leiden in den Niederlanden, die ich im Rahmen meiner Hospitation erlernen konnte.

Aus den peripheren Lymphozyten der Testpersonen und der gesunden Kontrollpersonen waren Zelllinien auf die für die Pathogenese des Typ I Diabetes möglicherweise relevanten Antigene gebildet worden.

Es werden nun die Zellen jeder Zelllinie erneut mit dem jeweiligen Antigen stimuliert. Dadurch soll getestet werden, ob eine Antigen- spezifische Proliferation erfolgt. Im Vergleich dazu werden die Zellen der Zelllinien mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) kokultiviert, um diese unspezifische Proliferation als Positiv- Kontrolle benutzen zu können. Ziel ist es, Unterschiede zwischen Test- und Kontrollpersonen zu untersuchen.

Der Ansatz erfolgt jeweils in Tripletts in komplettem Medium (IMDM mit 10% Humanserum), in 96- Lochplatten mit runden Vertiefungen.

Zunächst werden die Zellen jeder Zelllinie gesammelt und nach Auszählung auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml in komplettem IMDM eingestellt. Davon werden jeweils 50  $\mu$ l in die 96- Lochplatte pipettiert, sodass  $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung vorliegen.

Als Antigen- präsentierende Zellen werden autologe bestrahlte periphere Lymphozyten hinzugefügt. Durch die Bestrahlung haben sie die Fähigkeit zur

Proliferation verloren, können aber noch als Antigen- präsentierende Zellen fungieren.

Dafür werden die zuvor eingefrorenen Lymphozyten der Test- und Kontroll- Personen aufgetaut, auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt und mit 40 Gray (Kobalt- 60- Quelle) bestrahlt. Anschließend werden sie in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  in 50 µl komplettem IMDM der Kultur zugefügt.

Zuletzt wird der Kultur das jeweilige Antigen, gelöst in 50 µl komplettem Medium, zugegeben.

Neben der Positiv- Kontrolle mit PHA fungieren als Negativ- Kontrollen Ansätze ohne Antigenzusatz sowie ohne bestrahlte Lymphozyten.

Der Ansatz ist im Folgenden nochmals tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4 :            Ansatz des Lymphozytenproliferationsassays

T- Zellen einer Linie  +  bestrahlte Lymphozyten  +  spezifisches Antigen	T- Zellen einer Linie  +  bestrahlte Lymphozyten  +  PHA	T- Zellen einer Linie  +  bestrahlte Lymphozyten	T- Zellen einer Linie
--	--	--	--------------------------

Zur Kontrolle der Effektivität der Bestrahlung werden die bestrahlten Lymphozyten der verschiedenen Test- bzw. Kontrollpersonen miteinander kultiviert.

Auf diese Weise wird jede gebildete Zelllinie einzeln ausgetestet.

Dabei werden die spezifischen Antigene in den in der folgenden Tabelle dargestellten Konzentrationen eingesetzt.

Tabelle 5 :            Verwendete Konzentrationen der Antigene im  
Lymphozytenproliferationstest

Zell- Linie, gebildet auf	Antigen- Konzentration im Test auf antigen- spezifische Proliferation. Angaben jeweils pro Vertiefung, gelöst in 50 µl komplettem IMDM
Homogenat aus 500 humanen Pankreas- Inseln	Homogenat aus 5 humanen Pankreas- Inseln
Ultraschall- Homogenat aus 500 humanen Pankreas - Inseln	Ultraschall- Homogenat aus 5 humanen Pankreas - Inseln
64kD- Fraktion aus 200 humanen Pankreas - Inseln	64kD- Fraktion aus 2 humanen Pankreas- Inseln
Tetanol 0,5 % Endkonzentration	Tetanol 0,5 % Endkonzentration
Medium	kein Zusatz

Die Inkubation der Kulturen erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C in einem 95% Luft- 5% CO<sub>2</sub>- Gemisch für drei Tage.

Sechzehn Stunden vor Ablauf der Kulturdauer werden zu allen Vertiefungen 1 µCi 3H- Thymidin in 50 µl komplettem IMDM zugefügt.

Die Zellen werden nach Ablauf der Kulturdauer geerntet und die Proben in einem Flüssig- Szintillations- Counter gemessen.



Angegeben wird die gemessene 3H- Thymidin- Aufnahme in counts per minute (cpm). Aus den ermittelten cpm pro Triplett werden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet (Computerprogramm „Exel für Windows 95“). Weiterhin wird zum Ausschluß des Mediumeinflusses der Proliferationsindex (PI) gebildet. Dieser ist der Wert der 3H- Thymidin- Inkorporation in Anwesenheit des Antigens (Mittelwert) dividiert durch die Inkorporation in Abwesenheit des Antigens, also dem Medium- Wert (Mittelwert). Bei einem Proliferationsindex größer / gleich 2 wurde von einer Antigen- spezifischen Proliferation ausgegangen.

### **3.15 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Justus- Liebig Universität Gießen.

Die einfache Varianzanalyse erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS- PC plus (DOS- Version).

Zur Zusammenhangsprüfung zwischen Beobachtungspaaren im nicht parametrischen Fall wurde der  $\chi^2$ - Test für Kontingenztafeln verwendet.

Zwei qualitative Merkmale wurden mit dem Fisher's Exact Test für Kreuztabellen verglichen.

Mit Hilfe des nicht parametrischen Mann- Whitney U- Tests wurden zwei unabhängige Stichproben über Ränge miteinander verglichen.

Für mehrere voneinander unabhängige Stichproben wurde als Rangtest der Kruskal- Wallis- 1 Way- Test durchgeführt.

Zwei voneinander abhängige Stichproben wurden mit dem Wilcoxon- Matched- Pairs- signed Ranks Test (auch Wilcoxon- Vorzeichen- Test genannt), verglichen.

Als Signifikanzniveau zum Ausdruck der zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) wurde  $\alpha = 0,05$  zugrundegelegt. Dementsprechend wurden die Ergebnisse, aufgrund deren die Nullhypothese aufgegeben werden musste, benannt:

$p \geq 0.05$  nicht signifikant

$p < 0.05$  signifikant

$p < 0,001$  hoch signifikant.

Anleitung für die genannten Methoden stammte aus folgender Literatur:

Trampisch, HJ.; Windeler, J

Medizinische Statistik

Springer Verlag, 2. Auflage, 2000

## 4 Ergebnisse

Die Einteilung der untersuchten Personen erfolgte in frisch manifestierte Typ I Diabetiker (n=17), Verwandte ersten Grades (n=7) und gesunde Kontrollpersonen (n=17) wie in Kapitel 2 beschrieben.

### 4.1 Altersverteilung der Gruppen

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, wurden 17 frisch manifestierte Typ I Diabetiker untersucht, wobei die Blutentnahme innerhalb der ersten zwei Wochen nach Manifestation und vor der ersten Insulin- Gabe erfolgte. Das Durchschnittsalter der Diabetiker betrug 30,6 Jahre (Standardabweichung  $\pm 10,5$  Jahre).

Weiterhin wurden sieben Verwandte ersten Grades von Typ I Diabetikern untersucht. Ihr Durchschnittsalter betrug 35,6 Jahre (Standardabweichung  $\pm 14,1$  Jahre).

Als Kontrollpersonen dienten Nicht- Diabetiker ohne Typ I Diabetiker in der Familienanamnese. Ihr Durchschnittsalter betrug 29,4 Jahre (Standardabweichung 9,6 Jahre).

Die o. g. Gruppen wurden mittels einfacher Varianzanalyse (Computerprogramm SPSS- PC plus) hinsichtlich der Altersverteilung untersucht. Die Altersverteilung der Gruppen war nicht signifikant ( $p = 0,45$ ) unterschiedlich.

## 4.2 Geschlechtsverteilung der Gruppen

Die Verteilung der Geschlechter in den untersuchten Gruppen entsprach der Zufallsverteilung, wie mit dem  $\chi^2$ -Test für Kontingenztafeln nachgewiesen werden konnte ( $p = 0,38$ ).

Tabelle 6 :           Kontingenztafel der Geschlechtsverteilung in den einzelnen Gruppen

	<b>männlich</b>	<b>weiblich</b>	Summe
<b>Manifeste Diabetiker</b>	11 64,7	6 35,3	17 41,5
<b>Kontrollpersonen</b>	7 41,2	10 58,8	17 41,5
<b>Verwandte 1. Grades</b>	4 57,1	3 42,9	7 17,1
<i>Summe</i>	22 53,7	19 46,3	41 100

## 4.3 Inselzell- Antikörper- Bestimmung

Von den 17 frisch manifestierten Typ I Diabetikern wiesen 10 Personen (58,8%) erhöhte ICA- Titer auf, die zwischen 10 und 160 JDF Units lagen. Zwei Personen (11,7%) hatten mit 5 JDF- Units einen grenzwertigen Titer und bei 5 Personen (29,4%) waren keine Inselzell-Antikörper bestimmbar.

Bei den 7 Verwandten ersten Grades ergaben die ICA- Messung folgende Verteilung: Eine Person (14,3%) hatte mit 10 JDF- Units einen positiven ICA- Titer. Bei einer Person (14,3%) bestand ein mit 5 JDF- Units grenzwertiger Titer

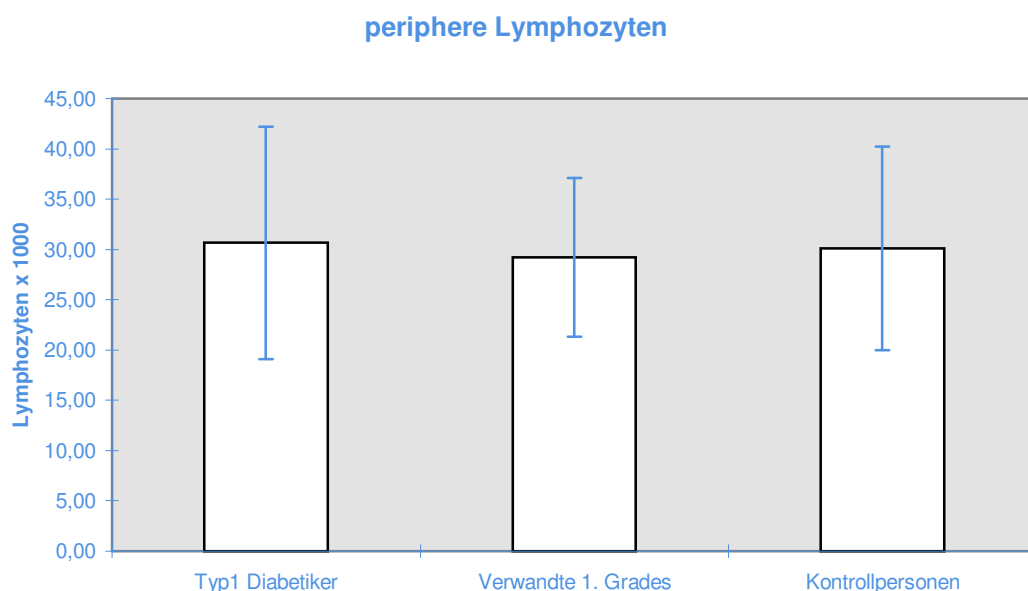
und bei fünf Personen (71,4%) konnten keine Inselzell- Antikörper nachgewiesen werden.

Alle Kontrollpersonen waren ICA negativ.

#### 4.4 Lymphozytenzahlen

Aus dem Venenblut der Probanden der o.g. Gruppen wurden die peripheren Lymphozyten nach der Methode von Boyum (Boyum, 1976) isoliert, ausgezählt und verglichen in Bezug auf ihre Zellzahl aus 20 ml Venenblut.

Die mittleren Anzahlen frisch isolierter peripherer Lymphozyten bezogen auf 20ml Venenblut wurden mittels Kruskal- Wallis 1- Way Test verglichen. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen waren nicht signifikant ( $p = 0,99$ ).



**Abb. 3** Mittlere Anzahlen frisch isolierter peripherer Lymphozyten der verschiedenen Gruppen

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der Zellzahlen von Frauen und Männern insgesamt sowie innerhalb der einzelnen Gruppen. Auch Alters- spezifische Unterschiede waren nicht nachzuweisen.

Die Gruppe der Diabetiker wurde anhand der ICA- Titer in 3 Gruppen unterteilt: ICA- Titer  $< 10$  JDF- Units ( $n = 7$ ), ICA- Titer  $\geq 10$  ( $n = 5$ ) und ICA- Titer negativ ( $n = 5$ ).

Aus dem peripheren Blut der Gruppe mit ICA- Titern  $< 10$  JDF- Units ließen sich im Mittel  $25,14 \times 10^6$  periphere Lymphozyten (Standardabweichung  $11,6 \times 10^6$ ) pro 20 ml isolieren. In der Gruppe mit ICA- Titern  $\geq 10$  JDF- Units waren es im Mittel  $32,32 \times 10^6$  Zellen (Standardabweichung  $5,74 \times 10^6$ ). In der Gruppe der ICA- negativen Diabetiker ließen sich im Mittel  $34,14 \times 10^6$  Zellen pro 20 ml isolieren (Standardabweichung  $16,6 \times 10^6$ ). Im Kruskal-Wallis-1-Way Test für mehrere Stichproben erreichten die Unterschiede kein Signifikanzniveau ( $p = 0,4$ ).

#### **4.5 Zellkultur und Zellwachstum**

Die isolierten Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Probanden wurden unter Einstellung einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  / ml in Iscove´s Modifiziertes Dulbecco´s Medium, IMDM, (Firma Gibco) kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  in einem 95% Luft- 5%CO<sub>2</sub>- Gemisch.

Zur Optimierung der Kulturbedingungen wurde das Kulturmedium mit 10% Serum (komplettes IMDM) ergänzt. Zum Ausschluss von xenogenen Interaktionen wurde dabei Humanserum statt z.B. fetalem Kälberserum verwendet. Um spezifische Interaktionen des Humanserums etwa eines Spenders auszuschließen, wurde ein Serumpool aus Serum von männlichen Spendern im Alter von 20 bis 40 Jahren gebildet. Frauen wurden als Spender wegen möglicher hormoneller zyklischer Einflüsse ausgeschlossen. Da der

zytotoxische Einfluss von Seren diabetischer Patienten bekannt ist (Lernmark et al., 1978), durften die Spender weder an Diabetes erkrankt, mit Typ I Diabetiker verwandt noch ICA- positiv sein.

Weiterhin wurden Spender ausgeschlossen, wenn sich in der Eigenanamnese Bluttransfusion oder Organtransplantation eruieren ließen. Auch eine aktuelle Infektion führte zum Ausschluss. Zur Inaktivierung von Komplement wurde eine Hitzeinaktivierung des Serums durchgeführt. Um zytotoxische Einflüsse des Serums auszuschließen, wurde eine gemischte Lymphozytenkultur durchgeführt.

Das Zellwachstum wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Dabei wurde auf Zelldichte, Zellform und Ausbildung von Zellausläufern geachtet.

In den folgenden Abbildung sind proliferierende Zellen zu sehen.

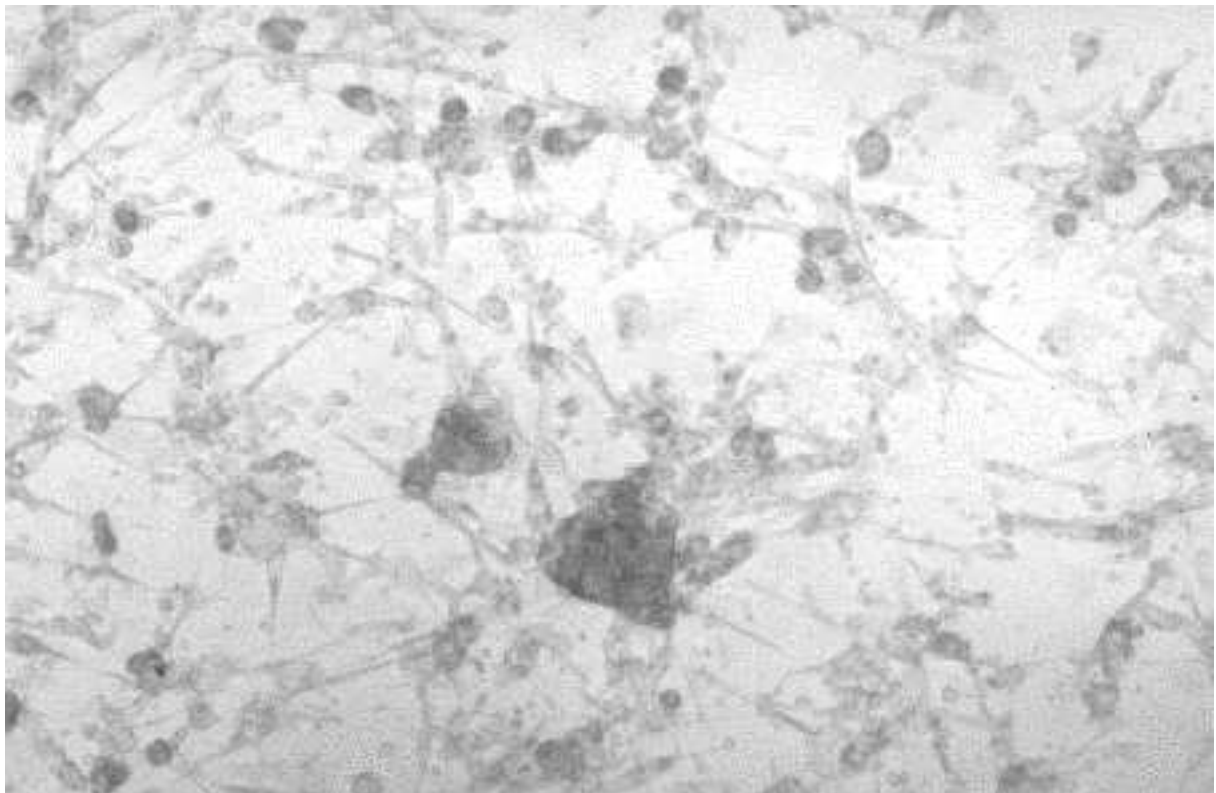


Abb. 4      Mikroskopische Ansicht von peripheren Lymphozyten, 24 Stunden Kulturdauer, hier am Beispiel der Zelllinienbildung auf Tetanol, 150fache Vergrößerung

Man erkennt in der obigen Abbildung als Zeichen der Aktivierung die Zellausläufer der peripheren Lymphozyten.

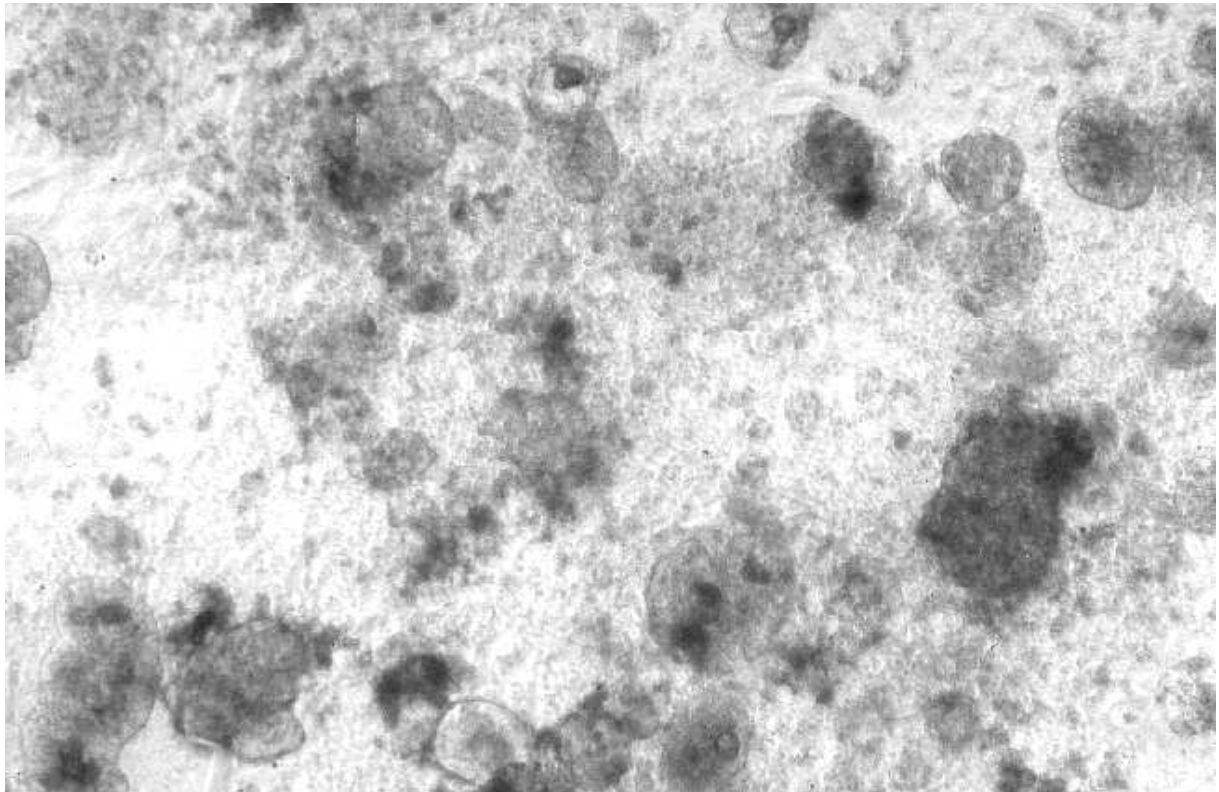


Abb. 5      Mikroskopische Ansicht von peripheren Lymphozyten, Tag 4 der Kultur der Tetanol- Zelllinienbildung, 150fache Vergrößerung

In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die Zellen sich deutlich vermehrt haben, typisch ist die Anordnung zu Konglomeraten.



In der folgenden Abbildung ist zu sehen, wie es mit zunehmender Kulturdauer zum Vollwachsen der Vertiefungen der Gewebekulturplatte kommt. Nach Resuspendieren wurde der Inhalt einer Vertiefung vorsichtig auf zwei Vertiefungen verteilt.

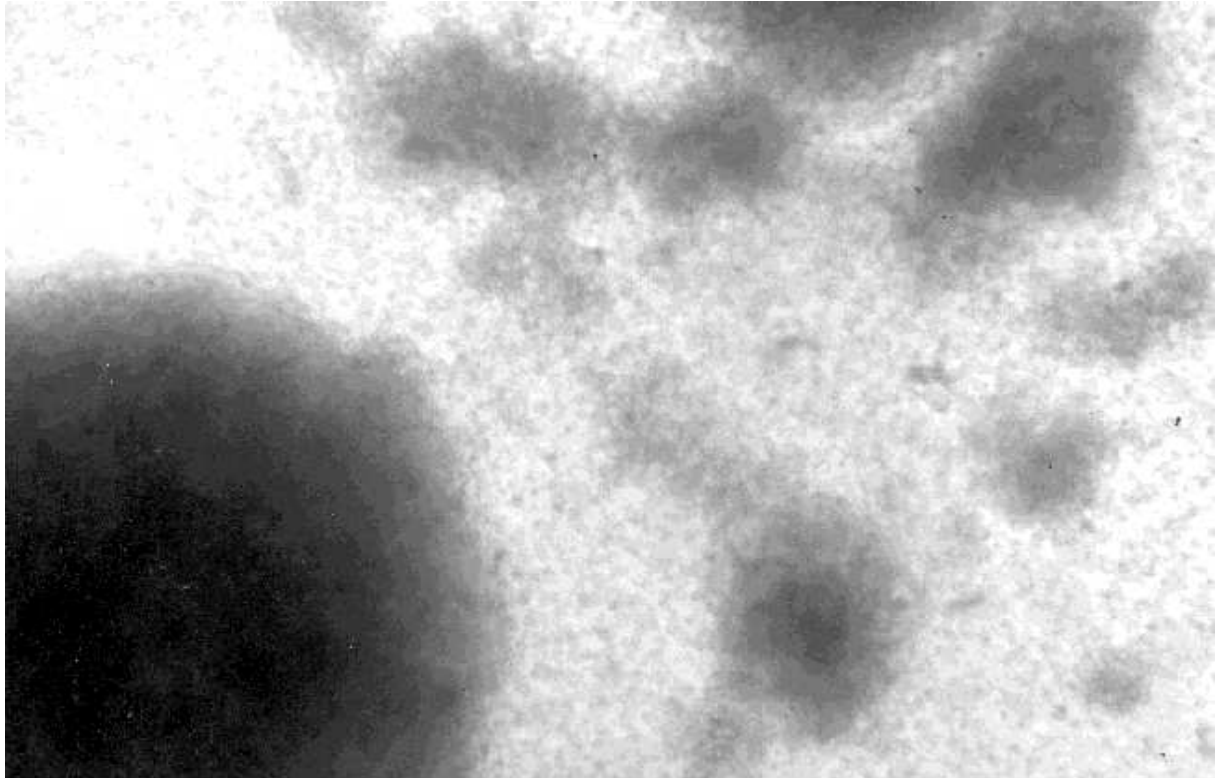


Abb. 6      Mikroskopische Ansicht von peripheren Lymphozyten,  
Tag 6 der Kultur der Tetanol- Zelllinienbildung ,  
150fache Vergrößerung

Unterschiede bei der Kultur mit den verschiedenen Antigenen ließen sich mikroskopisch nicht evaluieren.

#### **4.6 Die gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture test, MLC)**

Kultiviert man Lymphozyten zweier genetisch unterschiedlicher Individuen miteinander für fünf bis sechs Tage, unterliegen diese Zellen einer blastischen Transformation, wobei sie an Größe zunehmen, eine einfachere Gestalt annehmen und die Produktion von DNA beginnen (Brain et al., 1964). Das Ausmaß dieser Transformation kann gemessen werden, indem man, einige Stunden bevor die Zellen geerntet werden, radioaktiv markiertes Thymidin zur Kultur hinzufügt, und die DNS- Aufnahme misst.

Diese gemischte Lymphozytenkultur kann in eine „one- way- MLC“ umgewandelt werden, indem die Lymphozyten eines Individuums vor Ansetzen der Kultur durch Bestrahlung reaktionsunfähig gemacht werden.

Durch Serumzugabe können nun Alloantikörper oder andere Serumfaktoren *in vitro* erfasst werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine solche „Ein- Weg- MLC“ durchgeführt, um zytotoxische Einflüsse des Serumpools auszuschließen. Dafür wurden Zellkulturen mit Lymphozyten von drei zufällig ausgewählten Spendern angesetzt, wobei jeweils die Hälfte der Zellen jedes Spenders bestrahlt wurde.

Das von neun zufällig ausgewählten Spendern gesammelte Serum wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 Minuten in einem Wasserbad erhitzt. Von jeweils drei Spendern wurden Serumproben mit einander vermischt, die dann als Serumpool 1 (von Spender 1 - 3), Serumpool 2 (von Spender 4 - 6) und Serumpool 3 (von Spender 7 - 9) den Kulturen der gemischten Lymphozytenkultur zugegeben wurden.

Als Kontrollen wurden gemischte Lymphozytenkulturen mit Zusatz von fetalem Kälberserum und ohne Serum- Zusatz durchgeführt.

Die Kulturen wurden fünf Tage im Brutschrank kultiviert, anschließend erfolgte die Bestimmung der <sup>3</sup>H- Thymidin- Aufnahme.

Aufgrund der benötigten Menge an Humanserum für die weiteren Versuche wurde eine derartige Herstellung des Serumpools mit anschließender Austestung mittels gemischter Lymphozytenkultur zweimal durchgeführt.

Im folgenden sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

Legende :

A : Spender A	A* : Spender A
unbestrahlte Zellen	bestrahlte Zellen
B : Spender B	B* : Spender B
unbestrahlte Zellen	bestrahlte Zellen
C : Spender C	C* : Spender C
unbestrahlte Zellen	bestrahlte Zellen

Serumpool 1 : Serum der Spender 1 – 3

Serumpool 2 : Serum der Spender 4 – 6

Serumpool 3 : Serum der Spender 7 - 9

Tabelle 7: Erste gemischte Lymphozytenkultur

		cpm (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)		
A		A*	B*	C*
	ohne Serum	82 $\pm$ 12	2.140 $\pm$ 273	1.580 $\pm$ 619
	FCS	1.824 $\pm$ 939	27.031 $\pm$ 1.964	17.416 $\pm$ 911
	Serumpool 1	199 $\pm$ 23	36.092 $\pm$ 5.563	17.919 $\pm$ 2.787
	Serumpool 2	346 $\pm$ 203	33.083 $\pm$ 1.369	21.012 $\pm$ 1.581
	Serumpool 3	162 $\pm$ 13	40.100 $\pm$ 2951	14.050 $\pm$ 3.216
B				
	ohne Serum	2.446 $\pm$ 489	278 $\pm$ 174	1.415 $\pm$ 793
	FCS	17.661 $\pm$ 1.634	5.266 $\pm$ 1.668	13.549 $\pm$ 4.836
	Serumpool 1	23.840 $\pm$ 3.524	236 $\pm$ 75	22.999 $\pm$ 7.470
	Serumpool 2	31.952 $\pm$ 3.986	232 $\pm$ 29	15.940 $\pm$ 5.230
	Serumpool 3	35.511 $\pm$ 8.489	270 $\pm$ 31	6.694 $\pm$ 1.863
C				
	Ohne Serum	1.836 $\pm$ 185	1.356 $\pm$ 231	426 $\pm$ 256
	FCS	16.476 $\pm$ 1.709	12.079 $\pm$ 1.939	993 $\pm$ 718
	Serumpool 1	17.480 $\pm$ 3.677	23.986 $\pm$ 1.123	265 $\pm$ 85
	Serumpool 2	21.318 $\pm$ 581	25.509 $\pm$ 9.157	279 $\pm$ 69
	Serumpool 3	18.504 $\pm$ 2.889	18.261 $\pm$ 3.352	288 $\pm$ 121

Tabelle 8:            Zweite gemischte Lymphozytenkultur

	cpm (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)			
A		A*	B*	C*
	ohne Serum	72 $\pm$ 12	1.242 $\pm$ 294	976 $\pm$ 301
	FCS	123 $\pm$ 25	9.156 $\pm$ 1.212	6.543 $\pm$ 386
	Serumpool 1	152 $\pm$ 87	9.187 $\pm$ 3.594	7.686 $\pm$ 1.950
	Serumpool 2	155 $\pm$ 101	11.072 $\pm$ 1.561	8.954 $\pm$ 2.933
	Serumpool 3	110 $\pm$ 27	10.210 $\pm$ 1.011	8.832 $\pm$ 927
B				
	ohne Serum	1.405 $\pm$ 304	141 $\pm$ 34	1.356 $\pm$ 87
	FCS	5.628 $\pm$ 2.358	263 $\pm$ 78	11.336 $\pm$ 985
	Serumpool 1	7.181 $\pm$ 2.318	214 $\pm$ 76	12.241 $\pm$ 1.290
	Serumpool 2	8.519 $\pm$ 700	395 $\pm$ 105	10.530 $\pm$ 1.806
	Serumpool 3	9.093 $\pm$ 803	163 $\pm$ 44	11.502 $\pm$ 132
C				
	ohne Serum	832 $\pm$ 108	1.032 $\pm$ 326	123 $\pm$ 124 6
	FCS	7.526 $\pm$ 2.012	13.512 $\pm$ 1.354	212 $\pm$ 78
	Serumpool 1	8.121 $\pm$ 2.478	13.407 $\pm$ 908	192 $\pm$ 116
	Serumpool 2	7.538 $\pm$ 1.144	13.179 $\pm$ 1.955	216 $\pm$ 55
	Serumpool 3	8.776 $\pm$ 1.187	13.326 $\pm$ 1.317	165 $\pm$ 31

Zur Kontrolle der Effektivität der Bestrahlung wurden Stimulatorzellen aller Spender ohne Zusatz von Responderzellen miteinander kultiviert.

Tabelle 9: Kontrolle der Bestrahlungseffektivität,  
erste gemischte Lymphozytenkultur

	<b>cpm (Mittelwerte <math>\pm</math> Standardabweichung)</b>				
	Ohne Serum	FCS	Serum-pool 1	Serum-pool 2	Serum-pool 3
<b>A* + B*</b>	32	540	946	165	655
<b>B* + C*</b>	66	763	735	811	474
<b>A* + C*</b>	38	164	449	580	823

Tabelle 10: Kontrolle der Bestrahlungseffektivität,  
zweite gemischte Lymphozytenkultur

	<b>cpm (Mittelwerte <math>\pm</math> Standardabweichung)</b>				
	Ohne Serum	FCS	Serumpool 1	Serumpool 2	Serumpool 3
<b>A* + B*</b>	67	312	298	118	233
<b>B* + C*</b>	89	398	316	160	118
<b>A* + C*</b>	72	264	353	105	302

Bei der Interpretation der Ergebnisse wird deutlich, dass der Versuchsaufbau effektiv ist, da Responder- und Effektorzellen verschiedener Testpersonen miteinander reagieren, während dies bei Zellen einer Testperson nicht der Fall ist.

Weiterhin zeigen die Responderzellen unter Zusatz der verschiedenen Poole von humanem Serum eine deutlich höhere Proliferationsantwort. Dies ist sowohl ein Beweis für den positiven Effekt auf das Wachstum der isolierten Zellen, als auch ein Ausschluss von toxischen Einflüssen des Serums auf die Zellen.

Hinsichtlich der Spender der Lymphozyten für die MLC wurde darauf geachtet, dass es sich nicht um diabetische bzw. ICA- positive Personen handelt, da ein verändertes Verhalten der Lymphozyten diabetischer Personen in einer gemischten Lymphozytenkultur bekannt ist. Dies wurde sowohl von Knospe als auch Räsänen untersucht, die dadurch eine Aussage über Aktivierung, Proliferation und Interaktionen der Lymphozyten von Diabetikern gewinnen wollten. Beide zeigten eine reduzierte Aktivität der Lymphozyten frisch manifester Typ I Diabetiker im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Knospe et al., 1990; Räsänen et al., 1988).

#### **4.7 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Tetanol 1% als Recall- Antigen**

Tetanol wurde als Kontrollantigen benutzt, mit der Vorstellung, dass dieser Impfstoff gegen Tetanus- Antigen regelmäßig bei Impfungen gegen Wundstarrkrampf eingesetzt wird. Es müssten sich somit bei allen Personen Tetanol- spezifische, das heißt gegen Tetanus- Antigen spezifische, Zelllinien generieren lassen.

Nach Bildung von Zelllinien wurde im Lymphozytentransformationstest die Antigen- spezifische proliferative Antwort der Tetanol- Linien auf Tetanol durch Messen der <sup>3</sup>H- Thymidin- Inkorporation bestimmt. Als Negativ- Kontrolle wurde die proliferative Antwort der Tetanol- Zelllinie auf Medium, als Positiv- Kontrolle die Antwort auf Phytohämagglutinin (PHA) als unspezifisches Lektin untersucht.

#### 4.7.1 Proliferative Antwort auf Tetanol 1% als spezifisches Antigen, dargestellt in cpm; Medium und PHA als Kontrollen

Die Darstellung der Ergebnisse folgt in tabellarischer Form.

Tabelle 11: Proliferative Antwort der Tetanol- Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm ( Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung )					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Diabetiker	14.097	$\pm$ 743	145	$\pm$ 121	24.380	$\pm$ 2.350
2	Diabetiker	77	$\pm$ 12	264	$\pm$ 88	5.759	$\pm$ 438
3	Diabetiker	30.546	$\pm$ 2.146	12.952	$\pm$ 2.514	55.407	$\pm$ 9.171
4	Diabetiker	257	$\pm$ 86	613	$\pm$ 283	26.639	$\pm$ 7.002
5	Diabetiker	2.587	$\pm$ 1.034	764	$\pm$ 415	23.973	$\pm$ 2.283
6	Diabetiker	676	$\pm$ 885	1.097	$\pm$ 282	381	$\pm$ 121
7	Diabetiker	8.687	$\pm$ 2.333	344	$\pm$ 92	26.718	$\pm$ 1.155
8	Diabetiker	56.750	$\pm$ 12.235	19.831	$\pm$ 1.274	62.171	$\pm$ 13.036
9	Diabetiker	43.870	$\pm$ 10.062	3.435	$\pm$ 447	53.221	$\pm$ 562
10	Diabetiker	8.394	$\pm$ 841	24.142	$\pm$ 6.306	35.356	$\pm$ 4.107
11	Diabetiker	24.508	$\pm$ 5.007	38.871	$\pm$ 1.054	43.658	$\pm$ 1.704
12	Diabetiker	14.513	$\pm$ 407	8.126	$\pm$ 1.694	6.223	$\pm$ 1.242
13	Diabetiker	770	$\pm$ 173	884	$\pm$ 142	2.190	$\pm$ 518
14	Diabetiker	8.959	$\pm$ 1.170	8.294	$\pm$ 2.024	7.318	$\pm$ 1.217
15	Diabetiker	9.772	$\pm$ 3.391	831	$\pm$ 164	7.075	$\pm$ 1.092
16	Diabetiker	2.079	$\pm$ 1.326	1.283	$\pm$ 342	8.569	$\pm$ 785



Tabelle 12: Proliferative Antwort der Tetanol- Zelllinien der Verwandten ersten Grades im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm ( Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung )					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Verwandte	64	$\pm$ 18	251	$\pm$ 219	18.279	$\pm$ 454
2	Verwandte	7.731	$\pm$ 2.078	2.818	$\pm$ 962	7.348	$\pm$ 638
3	Verwandte	2.298	$\pm$ 307	105	$\pm$ 71	7.388	$\pm$ 536
4	Verwandte	2.467	$\pm$ 1.523	1.003	$\pm$ 63	8.594	$\pm$ 1.374
5	Verwandte	10.313	$\pm$ 3.184	1.651	$\pm$ 527	5.796	$\pm$ 1.472
6	Verwandte	26.402	$\pm$ 63	20.654	$\pm$ 1.314	47.839	$\pm$ 7.445
7	Verwandte	11.652	$\pm$ 1.269	127	$\pm$ 40	23.164	$\pm$ 6.920

Tabelle 13 : Proliferative Antwort der Tetanol- Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm ( Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung )					
		Tetanol		Medium		PHA	
1	Kontrolle	5.604	$\pm$ 722	1.974	$\pm$ 1.079	24.682	$\pm$ 1.547
2	Kontrolle	59	$\pm$ 21	141	$\pm$ 65	15.927	$\pm$ 400
3	Kontrolle	64	$\pm$ 18	251	$\pm$ 219	18.279	$\pm$ 454
4	Kontrolle	134	$\pm$ 89	87	$\pm$ 39	3.238	$\pm$ 405
5	Kontrolle	9.079	$\pm$ 1.976	224	$\pm$ 61	31.133	$\pm$ 3.882
6	Kontrolle	13.335	$\pm$ 7.448	1.890	$\pm$ 738	30.038	$\pm$ 1.698
7	Kontrolle	14.745	$\pm$ 2.193	1.802	$\pm$ 378	29.338	$\pm$ 2.739
8	Kontrolle	1.639	$\pm$ 1.054	264	$\pm$ 140	21.691	$\pm$ 1.770
9	Kontrolle	6.395	$\pm$ 1.013	6.689	$\pm$ 268	58.177	$\pm$ 1.881
10	Kontrolle	30.338	$\pm$ 1.857	3.582	$\pm$ 794	54.006	$\pm$ 4.204
11	Kontrolle	326	$\pm$ 103	379	$\pm$ 55	7.835	$\pm$ 1.511
12	Kontrolle	450	$\pm$ 460	154	$\pm$ 12	1.787	$\pm$ 345
13	Kontrolle	352	$\pm$ 110	311	$\pm$ 99	2.174	$\pm$ 945
14	Kontrolle	980	$\pm$ 1.059	125	$\pm$ 10	489	$\pm$ 191
15	Kontrolle	294	$\pm$ 121	190	$\pm$ 33	528	$\pm$ 85
16	Kontrolle	5.515	$\pm$ 824	2.628	$\pm$ 667	2.772	$\pm$ 655
17	Kontrolle	5.475	$\pm$ 1.810	2.426	$\pm$ 1.449	3.868	$\pm$ 2.995

#### 4.7.2 Vergleich der Proliferationsindizes auf Tetanol als spezifisches Antigen innerhalb der drei Gruppen

Um die Background- Proliferation zu berücksichtigen, wurde der Proliferationsindex gebildet. Dafür wurde der errechnete Mittelwert der 3H-Thymidin- Aufnahme (in cpm) in Anwesenheit des Antigens dividiert durch den Mittelwert der Aufnahme in Abwesenheit von Antigen, also dem Medium-Wert. Von einer spezifischen Proliferation wurde ausgegangen, wenn der ermittelte Proliferationsindex bei bzw. über 2 lag. Die errechneten Werte sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 14 : Proliferationsindizes der Tetanol Zelllinien

Tetanol 1% : Proliferationsindizes			
Nr.	Diabetiker	Verwandte	Kontrollen
1	97,22	0,25	2,84
2	0,29	2,74	0,42
3	2,36	21,89	0,25
4	0,42	2,46	1,54
5	3,39	6,25	40,53
6	0,61	1,28	7,05
7	25,25	91,75	8,18
8	1,15		6,22
9	12,77		0,96
10	0,35		8,47
11	0,63		0,86
12	1,79		2,92
13			1,13
14	0,87		7,82
15	1,08		1,55
16	11,76		2,1
17	1,62		2,26

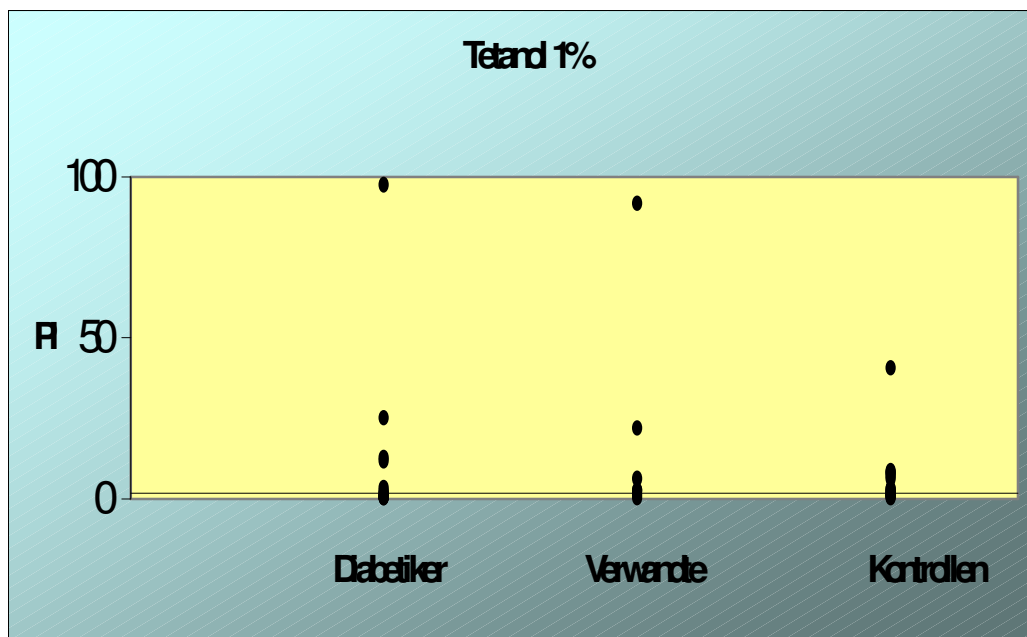


Abb. 7 : Proliferationsindizes der Tetanol Zelllinien

#### 4.7.3 Statistische Auswertung der Proliferationsindizes

Wie erwartet fand sich bei einem Großteil der Typ I Diabetiker, Verwandten ersten Grades und Kontrollpersonen eine positive Reaktion auf Tetanus- Toxoid. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

#### 4.7.4 Prozentuale Auswertung der positiven Proliferationsindizes

Von einer spezifischen Proliferation kann ausgegangen werden, wenn der Proliferationsindex  $\geq 2$  ist.

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wiesen 6 von 16 Personen einen  $PI \geq 2$  auf, entsprechend 37,5 %.

Bei den Verwandten ersten Grades befanden sich 5 Personen mit einem  $PI \geq 2$ , entsprechend 71 %, während unter den Kontrollpersonen 59 % einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 10 von 17 Personen.

#### **4.7.5 Proliferative Antwort der Zelllinien in cpm / PI in Abhängigkeit des ICA- Titers**

Wie einleitend beschrieben, erfolgte eine Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker anhand der Höhe ihres ICA- Titers in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal-Wallis 1-Way Test).

Die Untersuchung der Proliferationsantwort in cpm erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untergruppen der Typ I Diabetiker.

Bei dem Vergleich der Proliferationsindizes zeichnete sich eine tendenziell bessere Antwort der Zellen der Untergruppe 1 (ICA- Titer < 10 JDF- Units) ab, ohne aber Signifikanzniveau zu erreichen ( $p=0,072$ ).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Versuchsaufbau geeignet ist, um eine spezifische Proliferation von Lymphozyten auf ein Antigen nachzuweisen. Darauf aufbauend werden im folgenden die für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I diskutierten körpereigenen Antigene im gleichen Verfahren eingesetzt. Damit soll überprüft werden, ob sich eine spezifische Proliferation der Lymphozyten auf diese Antigene nachweisen lässt. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob sich bezüglich einer spezifischen Proliferation die Lymphozyten der Typ I Diabetiker und ihrer Angehörigen ersten Grades von Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen unterscheiden.

## **4.8 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf Inselhomogenat als spezifisches Antigen**

Für den Versuch, spezifische T- Zelllinien auf Inselhomogenat zu generieren, wurden  $1 \times 10^6$  periphere Lymphozyten unter Zusatz von einem Homogenat aus 500 humanen Pankreas- Inseln als Antigen kultiviert. Nach der Zelllinien-Bildung wurde im Lymphozytenproliferationstest die spezifische Proliferation der Zellen dieser Homogenat- Linien untersucht. Dafür wurde die 3H-Thymidin-Inkorporation nach erneuter Stimulation der Zellen mit Inselhomogenat gemessen. Als Negativ- Kontrolle wurde die 3H- Thymidin- Aufnahme dieser Zellen untersucht ohne vorherigen Zusatz des Antigens, als Positiv- Kontrolle diente eine vorherige Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA).

### **4.8.1 Proliferative Antwort auf Inselhomogenat als spezifisches**

#### **Antigen, dargestellt in cpm; Medium und PHA als Kontrollen**

Die im Lymphozytenproliferationstest ermittelten Werte der 3H- Thymidin-Inkorporation sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte der counts per minute (cpm), des weiteren ist die Standardabweichung aufgeführt. Die spezifische Proliferation der Lymphozyten der Typ I Diabetiker und die ihrer Verwandten ersten Grades wird verglichen mit der gesunder Kontrollpersonen.

Tabelle 15: Proliferative Antwort der Inselhomogenat- Zelllinien der Typ I Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)		
		Inselzell-Homogenat	Medium	PHA
1	Diabetiker	4.096 $\pm$ 308	3.438 $\pm$ 365	22.850 $\pm$ 552
2	Diabetiker	714 $\pm$ 420	397 $\pm$ 224	28.023 $\pm$ 1.761
3	Diabetiker	10.277 $\pm$ 7.156	4.794 $\pm$ 425	57.394 $\pm$ 8.521
4	Diabetiker	989 $\pm$ 64	629 $\pm$ 107	21.906 $\pm$ 3.803
5	Diabetiker	5.952 $\pm$ 669	4.073 $\pm$ 474	21.983 $\pm$ 905
6	Diabetiker	5.274 $\pm$ 1.870	3.876 $\pm$ 1.165	17.144 $\pm$ 2.634
7	Diabetiker	386 $\pm$ 347	1.016 $\pm$ 230	15.262 $\pm$ 1.198
8	Diabetiker	8.134 $\pm$ 1.410	8.593 $\pm$ 1.659	10.091 $\pm$ 3.150
9	Diabetiker	8.024 $\pm$ 4.269	3.053 $\pm$ 1.742	70.538 $\pm$ 9.659
10	Diabetiker	91.759 $\pm$ 1.352	76.691 $\pm$ 2.504	75.601 $\pm$ 9.326
11	Diabetiker	83.015 $\pm$ 5.596	87.385 $\pm$ 2.496	91.880 $\pm$ 2.844
12	Diabetiker	12.095 $\pm$ 3.603	579 $\pm$ 561	1.732 $\pm$ 1.331
13	Diabetiker	20.031 $\pm$ 9.364	3.114 $\pm$ 2.127	2.598 $\pm$ 2.304
14	Diabetiker	25.375 $\pm$ 4.316	259 $\pm$ 116	1.098 $\pm$ 191
15	Diabetiker	10.962 $\pm$ 1.534	2.315 $\pm$ 270	15.700 $\pm$ 4.390
16	Diabetiker	8.564 $\pm$ 1.266	606 $\pm$ 294	11.725 $\pm$ 8.575

Tabelle 16: Proliferative Antwort der Inselhomogenat- Zelllinien der Verwandten 1. Grades im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)		
		Inselzell-Homogenat	Medium	PHA
1	Verwandte	2.218 $\pm$ 377	2.368 $\pm$ 328	24.823 $\pm$ 1.329
2	Verwandte	3.744 $\pm$ 1.101	2.336 $\pm$ 460	16.348 $\pm$ 3.545
3	Verwandte	2.926 $\pm$ 775	2.317 $\pm$ 250	8.209 $\pm$ 2.002
4	Verwandte	4.707 $\pm$ 351	1.091 $\pm$ 578	5.151 $\pm$ 1.035
5	Verwandte	7.808 $\pm$ 1.196	4.823 $\pm$ 1.069	11.000 $\pm$ 895
6	Verwandte	4.879 $\pm$ 541	4.462 $\pm$ 396	9.510 $\pm$ 1.288
7	Verwandte	6.172 $\pm$ 672	4.843 $\pm$ 1.735	27.668 $\pm$ 944

Tabelle 17: Proliferative Antwort der Inselhomogenat- Zelllinien der Kontrollpersonen im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)					
		Inselzell-Homogenat		Medium		PHA	
1	Kontrolle	4.544	$\pm$ 756	629	$\pm$ 107	21.906	$\pm$ 3.803
2	Kontrolle	2.845	$\pm$ 502	3.220	$\pm$ 314	18.445	$\pm$ 182
3	Kontrolle	3.744	$\pm$ 1.101	2.336	$\pm$ 460	16.348	$\pm$ 3.545
4	Kontrolle	5.143	$\pm$ 1.064	5.249	$\pm$ 525	3.485	$\pm$ 664
5	Kontrolle	12.310	$\pm$ 646	9.693	$\pm$ 1.805	36.073	$\pm$ 5.078
6	Kontrolle	8.941	$\pm$ 781	1.268	$\pm$ 575	21.376	$\pm$ 1.144
7	Kontrolle	825	$\pm$ 899	24.058	$\pm$ 987	25.244	$\pm$ 1.448
8	Kontrolle	2.685	$\pm$ 221	1.862	$\pm$ 1.561	58.663	$\pm$ 5.051
9	Kontrolle	14.030	$\pm$ 1.306	565	$\pm$ 136	2.358	$\pm$ 184
10	Kontrolle	10.597	$\pm$ 1.113	383	$\pm$ 164	4.146	$\pm$ 2.293
11	Kontrolle	8.592	$\pm$ 950	524	$\pm$ 278	2.373	$\pm$ 1.667
12	Kontrolle	8.523	$\pm$ 266	273	$\pm$ 196	2.298	$\pm$ 1.056
13	Kontrolle	10.915	$\pm$ 923	166	$\pm$ 9	1.213	$\pm$ 843
14	Kontrolle	9.746	$\pm$ 1.596	198	$\pm$ 20	907	$\pm$ 231
15	Kontrolle	15.948	$\pm$ 4.448	4.069	$\pm$ 984	2.004	$\pm$ 1.518

#### **4.8.2 Vergleich der Proliferationsindizes auf Inselhomogenat als spezifisches Antigen innerhalb der drei Gruppen**

Es wurde erneut der Proliferationsindex gebildet, um die Background-Proliferation zu berücksichtigen. Dafür wurde der errechnete Mittelwert der 3H-Thymidin- Aufnahme (in cpm) in Anwesenheit des Antigens dividiert durch den Mittelwert der Aufnahme in Abwesenheit von Antigen. Von einer spezifischen Proliferation wurde ausgegangen, wenn der ermittelte Proliferationsindex bei bzw. über 2 lag. Die errechneten Werte sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 18: Proliferationsindizes der Inselhomogenat- Zelllinien

Proliferationsindizes			
Nr.	Diabetiker	Verwandte	Kontrollen
1	0,19	0,94	7,22
2	1,80	1,60	0,88
3	2,14	1,26	1,60
4	1,57	4,31	0,98
5	1,46	1,62	1,27
6	1,36	1,09	7,05
7	0,38	1,27	0,03
8	0,95		1,44
9	2,63		24,83
10	1,20		27,67
11	0,95		16,39
12	20,89		31,22
13	6,43		65,75
14	97,97		49,22
15	4,74		3,92
16	14,13		

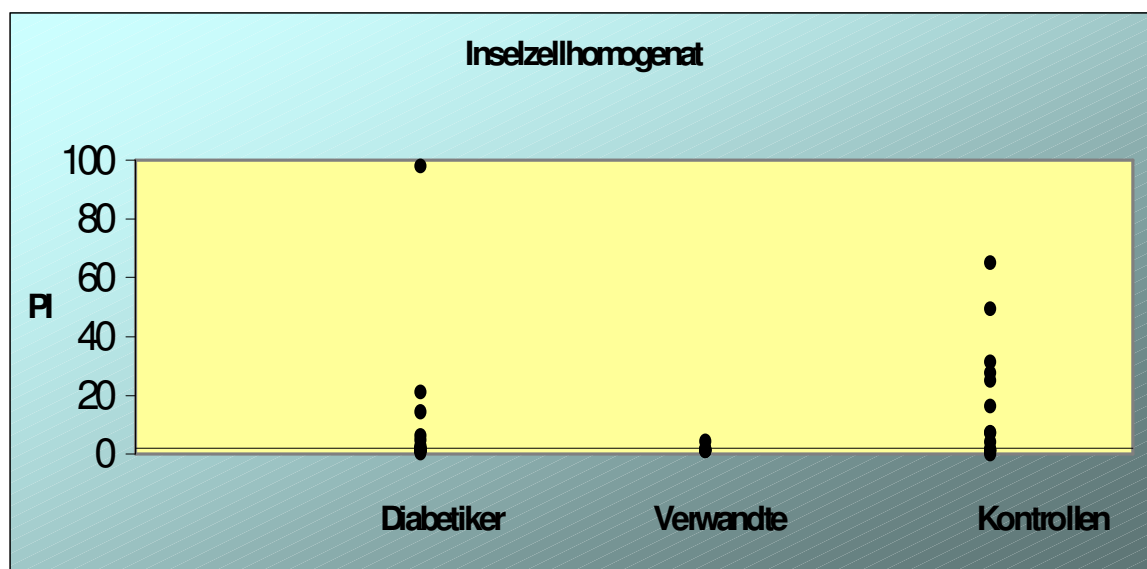


Abb. 8 Proliferationsindizes der Inselhomogenat- Zelllinien



#### **4.8.3 Statistische Auswertung**

Der Vergleich der Proliferationsindizes der drei untersuchten Gruppen mittels Kruskal- Wallis 1-Way Test ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,202$ ).

#### **4.8.4 Auswertung Responder versus Non- Responder**

Um den Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferation der Zellen auszuschließen, wurde der Proliferationsindex (PI) gebildet.

Bei einem Proliferationsindex  $\geq 2$  wurde von einer spezifischen Proliferation ausgegangen.

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wiesen 7 von 16 Personen einen PI  $\geq 2$  auf, entsprechend 44%. Bei den Verwandten ersten Grades befand sich 1 Person mit einem PI  $\geq 2$ , entsprechend 14%, während unter den Kontrollpersonen 60% einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 9 von 15 Personen.

Die statistische Auswertung mittels Fisher' s Exact Test ergab, dass bei Verwandten ersten Grades tendenziell weniger häufig Antworten auf Homogenat gemessen werden als bei Typ I Diabetikern ( $p=0,07$ ) oder Kontrollpersonen ( $p=0,06$ ).

#### **4.8.5 Proliferative Antwort der Zelllinien in cpm / PI in Abhängigkeit des ICA- Titors**

Weiterhin wurden die Proliferationsindizes in Bezug auf die Höhe des ICA- Titors untersucht, wobei drei Gruppen gebildet wurden.

Es wurde dafür der Kruskal- Wallis 1- Way Test herangezogen:

Tabelle 19:      Kruskal- Wallis 1- Way Test zur Untersuchung der Proliferationsindizes der Zellen der Homogenat– Linie in Bezug auf die Höhe der ICA- Titer

Gruppe	ICA - Titer	Probenanzahl	Mittlerer Rang
Gruppe 1	< 10 JDF - Units	4	4,25
Gruppe 2	$\geq$ 10 JDF - Units	5	9,40
Gruppe 3	negativ	4	8,20

Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,1665$ ).

Auf die gleiche Weise wurden auch die cpm in Bezug auf den ICA- Titer untersucht, wobei sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,4525$ ) ergaben.

#### **4.8.6      Proliferative Antwort auf Ultraschall- homogenisierte humane Inseln**

Um zu testen, ob bei einer zusätzlichen Behandlung des Inselhomogenats mittels Ultraschall eine stärkere Lymphozytenreaktion gemessen werden kann, wurden die Lymphozyten einer kleinen Anzahl von Personen mit dieser Antigenpräparation getestet. Dafür wurden die humanen Inselzellen mittels Ultraschall zerkleinert. Dieses Ultraschallhomogenat wurde als Antigen bei der Zellliniengeneration eingesetzt. Im anschließend durchgeführten Lymphozytenproliferationstest wurde untersucht, ob sich eine spezifische Proliferation nachweisen ließ.

Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

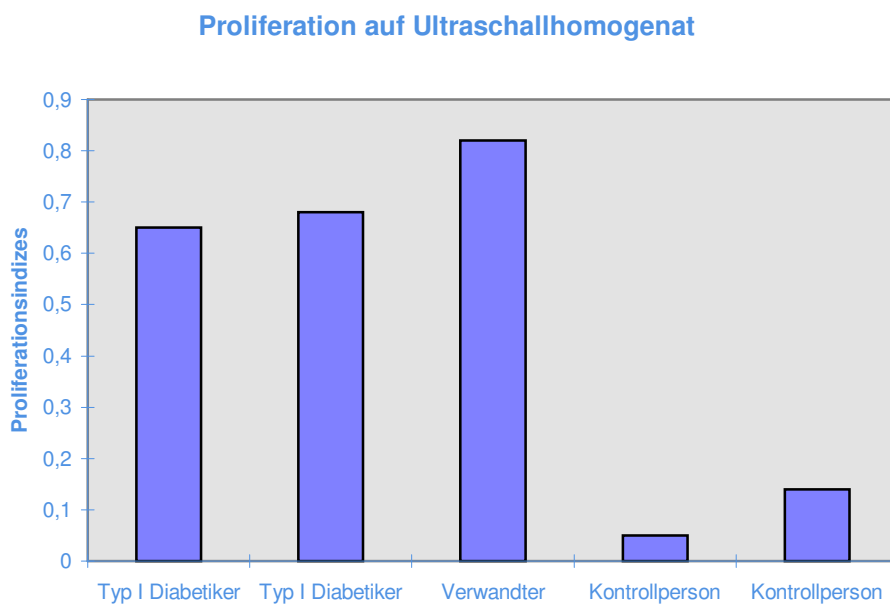
Tabelle 20: Proliferative Antwort der Ultraschallhomogenat- Linien bei  
Typ I Diabetikern und Verwandten ersten Grades

<b>Typ I Diabetiker</b>			
	Ultraschall- homogenat	PHA	Medium
Cpm	2.716	24.365	2.059
	1.314	16.148	3.573
	1.512	27.136	2.090
Mittelwert	1.667	22.550	2.574
Standardabweichung	452	5.715	865
Proliferationsindex	0,65	8,76	
<b>Typ I Diabetiker</b>			
	Ultraschall- homogenat	PHA	Medium
Cpm	5.414	18.282	5.982
	2.406	16.854	4.909
	3.056	13.746	4.999
Mittelwert	3.625	16.294	5.297
Standardabweichung	1.583	2.319	595
Proliferationsindex	0,68	3,08	
<b>Verwandter 1. Grades</b>			
	Ultraschall- homogenat	PHA	Medium
Cpm	2.179		2.912
	3.252	21.975	2.755
	1.249	21.873	2.527
Mittelwert	2.227	21.924	2.731
Standardabweichung	1.002	72	193
Proliferationsindex	0,82	8,03	

Tabelle 21: Proliferative Antwort der Ultraschallhomogenat- Linien bei gesunden Kontrollpersonen

<b>Kontrollperson</b>			
	Ultraschall-homogenat	PHA	Medium
Cpm	126	27.281	2.796
	82	25.795	1.066
	17	28.527	141
Mittelwert	75	27.201	1.334
Standardabweichung	55	1.368	1.348
Proliferationsindex	0,05	20,39	
<b>Kontrollperson</b>			
	Ultraschall-homogenat	PHA	Medium
Cpm	600	24.545	6.296
	624	33.181	5.839
	956	34.542	3.935
Mittelwert	727	30.756	5.357
Standardabweichung	199	5.422	1.252
Proliferationsindex	0,14	5,74	

Es folgt die graphische Darstellung der Proliferationsindizes.



**Abb. 9:** Proliferationsindizes der Ultraschallhomogenat- Linien

Auffällig ist die sehr niedrige <sup>3</sup>H- Thymidin- Aufnahme der Ultraschallhomogenat- Linien auf das Ultraschallhomogenat bei den Kontrollpersonen. Es ist zu beachten, dass diese Zellen durch Stimulation mit dem unspezifischen Lektin Phytohämagglutinin (PHA) mit einer guten Proliferation reagierten.

In der folgenden Tabelle wird die Proliferation der Lymphozyten der verschiedenen Testpersonen auf Inselhomogenat verglichen mit der Proliferation auf Ultraschallhomogenat.

Tabelle 22: Proliferationsindizes der Inselhomogenat- und Ultraschallhomogenat- Zelllinien

	Typ I Diabetiker		Verwandte	Kontrollen	
	1	2	1	1	2
PI Inselhomogenat	1,36	0,38	1,27	0,03	7,05
PI Ultraschallhomogenat	0,65	0,68	0,82	0,14	0,05

Signifikante Unterschiede ergeben sich nicht.

#### **4.8.7 Zweiter Stimulationszyklus**

Die gezüchteten Zellen aus 4.8.1 wurden in einem zweiten Stimulationszyklus nochmals mit Inselhomogenat stimuliert, unter der Vorstellung, dass damit selektiv die Insel- spezifischen Zellen herausgezüchtet werden können.

Dabei wurden die Zellen nach dem ersten Stimulationszyklus nochmals mit dem Inselhomogenat in gleicher Konzentration unter Zugabe von Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen nochmals unter Zugabe von Lymphocult als Quelle für Interleukin- 2 kultiviert.

Nach der Zelllinien- Bildung wurde im Lymphozytenproliferationstest die spezifische Proliferation der Zellen der Homogenat- Linie auf Inselhomogenat

über die 3H- Thymidin- Inkorporation gemessen. Als Negativ- Kontrolle wurde die Proliferation der Zellen ohne Antigen- Zusatz untersucht.

Es folgt die tabellarische und graphische Darstellung der Proliferationsindizes beider Zyklen.

Tabelle 23: Proliferationsindex (PI) der Zellen der Homogenat – Linie nach erstem und zweitem Stimulationszyklus

	Diabetiker			Verwandte	Kontrollen	
Nr.	1	2	3	1	1	2
PI 1. Zyklus	1,46	1,36	0,38	1,27	1,27	7,05
PI 2. Zyklus	1,2	0,81	0,88	0,48	1,15	0,86

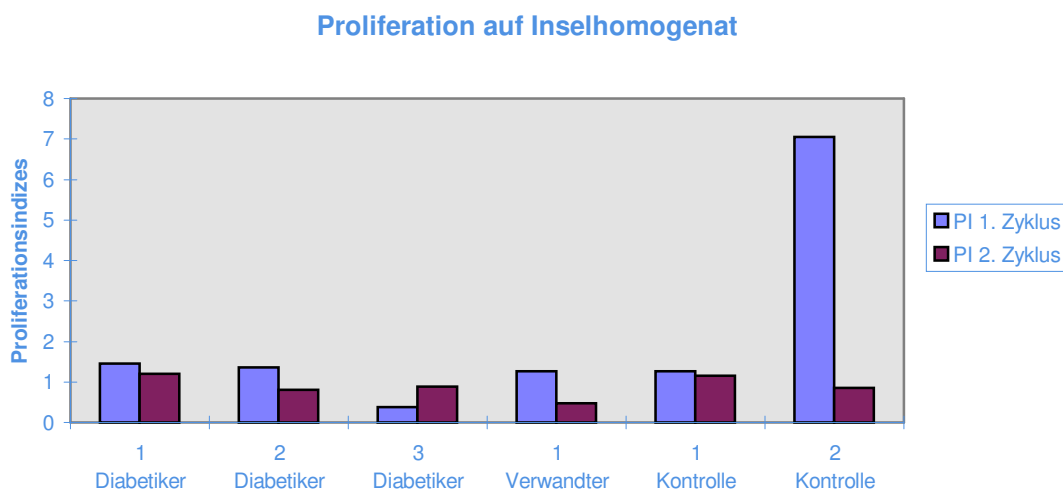


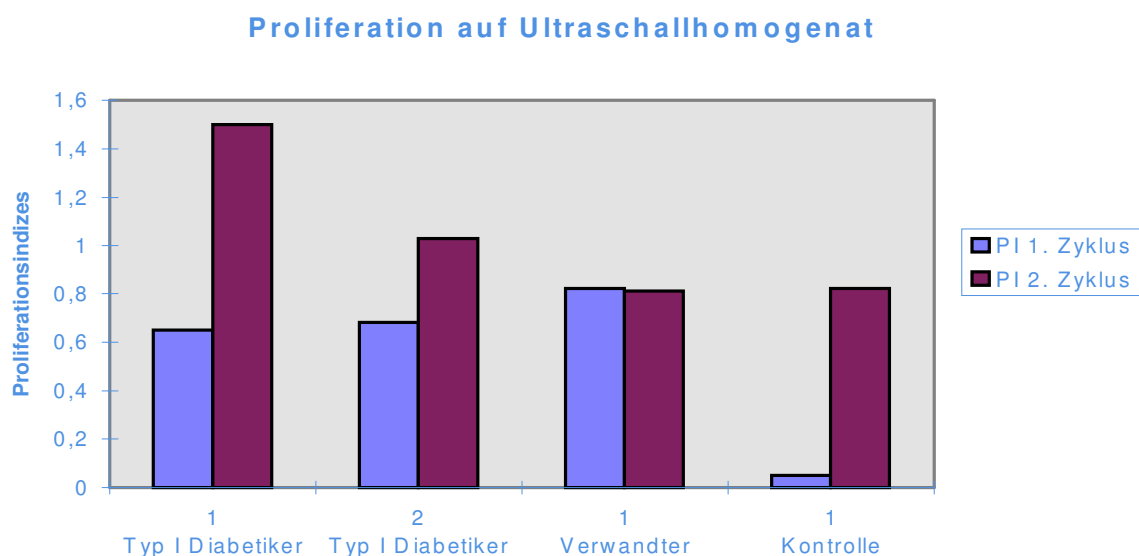
Abb. 10: Vergleich der Proliferationsindizes der Inselhomogenat- Zelllinien nach erster und zweiter Stimulation

Wie aus Tabelle 23 und Abbildung 10 ersichtlich ist, konnte durch die zusätzliche Stimulation mit Inselhomogenat keine erhöhte Spezifität der Reaktivität auf Inselhomogenat erzielt werden.

Für Ultraschallhomogenat ergab der Vergleich zwischen erstem und zweitem Stimulationszyklus die folgenden tabellarisch aufgeführten Werte.

**Tabelle 24:** Vergleich der Proliferationsindizes (PI) der Ultraschallhomogenat- Zelllinien nach erster und zweiter Stimulation

	Typ I Diabetiker		Verwandte	Kontrolle
Nr.	1	2	1	1
PI 1. Zyklus	0,65	0,68	0,82	0,05
PI 2. Zyklus	1,5	1,03	0,81	0,82



**Abb.11:** Vergleich der Proliferationsindizes (PI) der Ultraschallhomogenat- Zelllinien nach erster und zweiter Stimulation

Auch bei den Ultraschallhomogenat- Linien konnte durch eine zweite Stimulation mit Ultraschallhomogenat wie aus Tabelle 24 und Abbildung 11 ersichtlich ist, keine erhöhte Spezifität der Reaktivität auf Inselhomogenat erzielt werden.

## 4.9 Ergebnisse der Untersuchung einer spezifischen Proliferation auf das 64kD- Antigen

Gemäß der oben beschriebenen Methodik wurde eine Fraktionierung der humanen Inseln durchgeführt. Die 64kD- Fraktion wurde eingesetzt für den Versuch, spezifische T- Zelllinien auf GAD zu generieren. Es wurden  $1 \times 10^6$  periphere Lymphozyten unter Zusatz der 64kD- Fraktion aus 200 humanen Pankreas- Inseln kultiviert.

Im Lymphozytenproliferationstest wurde die spezifische Proliferation der Zelllinie untersucht. Vergleichend wurde die unspezifische Proliferation der Zellen nach Stimulation mit dem Lektin Phytohämagglutinin PHA untersucht. Als Negativ- Kontrolle wurde die Proliferation der Zellen unter Abwesenheit des Antigens gemessen.

### 4.9.1 Proliferative Antwort auf die 64kD- Fraktion

In den folgenden Tabellen werden die gemessenen Counts per minute (cpm) angegeben.

Tabelle 25: Proliferative Antwort der 64kD- Zelllinien der Diabetiker im Lymphozytenproliferationstest

Nr.	Gruppe	cpm ( Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung )					
		64 kD		Medium		PHA	
1	Diabetiker	1.794	$\pm$ 1.557	1.168	$\pm$ 139	39.395	$\pm$ 1.188
2	Diabetiker	56.602	$\pm$ 3.864	52.744	$\pm$ 8.539	55.649	$\pm$ 2.044
3	Diabetiker	1.968	$\pm$ 437	2.225	$\pm$ 214	75.561	$\pm$ 8.926
4	Diabetiker	74.510	$\pm$ 882	83.475	$\pm$ 6.442	80.003	$\pm$ 4.403
5	Diabetiker	76.464	$\pm$ 13.329	86.577	$\pm$ 1.100	26.430	$\pm$ 37.436
6	Diabetiker	767	$\pm$ 237	433	$\pm$ 88	2.273	$\pm$ 404
7	Diabetiker	258	$\pm$ 63	5.261	$\pm$ 1.395	4.120	$\pm$ 3.139
8	Diabetiker	4.634	$\pm$ 3.253	3.840	$\pm$ 1.958	9.367	$\pm$ 3.542
9	Diabetiker	944	$\pm$ 96	517	$\pm$ 233	4.366	$\pm$ 644
10	Diabetiker	670	$\pm$ 264	742	$\pm$ 511	8.850	$\pm$ 1.011
11	Diabetiker	492	$\pm$ 53	847	$\pm$ 257	7.512	$\pm$ 1.093



Tabelle 26 : Proliferative Antwort der 64kD- Zelllinien der Kontrollpersonen, dargestellt in cpm; Medium und PHA als Kontrollen

Nr.	Gruppe	cpm ( Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung )					
		64 kD		Medium		PHA	
1	Kontrolle	36.037	$\pm$ 2.509	30.725	$\pm$ 6.094	35.275	$\pm$ 4.885
2	Kontrolle	22.030	$\pm$ 1.370	16.773	$\pm$ 671	18.287	$\pm$ 1.447
3	Kontrolle	1.866	$\pm$ 209	1.421	$\pm$ 368	46.209	$\pm$ 3.580
4	Kontrolle	1.045	$\pm$ 612	1.172	$\pm$ 1.451	7.603	$\pm$ 1.441
5	Kontrolle	597	$\pm$ 77	398	$\pm$ 319	2.196	$\pm$ 361
6	Kontrolle	614	$\pm$ 181	427	$\pm$ 229	1.471	$\pm$ 697
7	Kontrolle	234	$\pm$ 152	365	$\pm$ 97	432	$\pm$ 268
8	Kontrolle	399	$\pm$ 97	156	$\pm$ 37	511	$\pm$ 51
9	Kontrolle	791	$\pm$ 347	458	$\pm$ 295	465	$\pm$ 113
10	Kontrolle	6.117	$\pm$ 1.007	3.805	$\pm$ 3.119	595	$\pm$ 226

#### **4.9.2 Vergleich der Proliferationsindizes auf 64kD als spezifisches Antigen innerhalb der Diabetiker und Kontrollen**

Um den Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferation der Zellen auszuschließen, wurde der Proliferationsindex gebildet, indem der errechnete Mittelwert der cpm unter Anwesenheit von Antigen dividiert wurde durch den Mittelwert der Mediumwerte. Von einer spezifischen Proliferation kann ausgegangen werden, wenn der Proliferationsindex  $\geq 2$  ist.

Im Folgenden werden die errechneten Proliferationsindizes für die 64kD- Linie bei Typ I Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tabelle 27: Proliferationsindizes der 64kD Zelllinien

64kD : Proliferationsindizes		
Nr.	Diabetiker	Kontrollen
1	1,54	1,17
2	1,07	1,31
3	0,88	1,31
4	0,89	0,89
5	0,89	1,50
6	1,77	1,44
7	0,05	0,64
8	1,21	2,56
9	1,82	1,73
10	0,90	1,61
11	0,58	

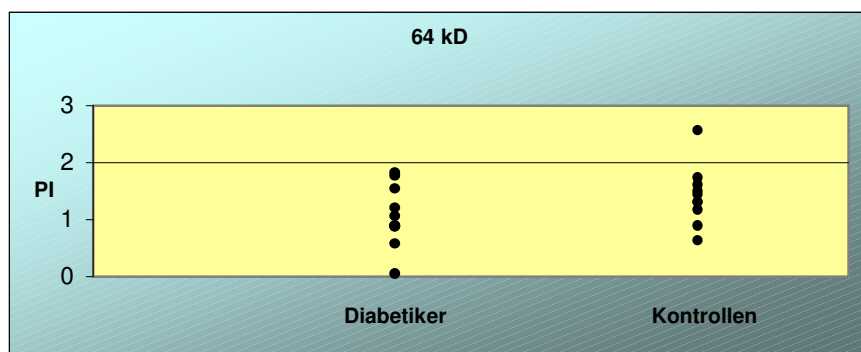


Abb. 12: Proliferationsindizes der 64kD Zelllinien

#### **4.9.3 Statistische Auswertung**

Der Vergleich der Proliferationsindizes erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ I Diabetikern und Kontrollpersonen ( $p=0,169$ ; Mann-Whitney U- Test).

#### **4.9.4 Auswertung Responder versus Non- Responder**

In der Gruppe der Typ I Diabetiker wiesen 0 von 11 Personen einen  $PI \geq 2$  auf, entsprechend 0%, während unter den Kontrollpersonen 10% einen positiven PI aufwiesen, entsprechend 1 von 10 Personen.

#### **4.9.5 Proliferative Antwort der Zelllinien in Abhängigkeit des ICA- Titers**

Wie einleitend beschrieben, erfolgte die Unterteilung der Gruppe der Typ I Diabetiker in drei Untergruppen, welche dann hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht wurden (Kruskal- Wallis 1-Way Test).

Weder für die proliferative Antwort in cpm ( $p=0,821$ ), noch hinsichtlich der Proliferationsindizes ( $p=0,144$ ) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

## 5 Diskussion

Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus ist nicht bis ins Detail geklärt.

Eine Reihe von Phänomenen deutet jedoch darauf hin, daß es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt. Dazu zählen das Auftreten von Antikörpern, die Assoziation bestimmter HLA- Typen mit der Erkrankung, Beobachtungen zur Insulitis, Transferversuche am Tiermodell sowie der Therapieerfolg mit Immunsuppressiva beim Mensch und im Tiermodell.

Die Mechanismen in der Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes mellitus resultieren in einer Zerstörung der Langerhans' schen Inselzellen des Pankreas. Die Beteiligung von Lymphozyten an diesem Prozeß ist bekannt. Bislang ist nicht geklärt, welche Strukturen der Beta- Zellen als Autoantigen wirken, somit die Lymphozyten aktivieren und damit den Autoimmunprozess auslösen.

Diese Arbeit untersucht, ob eine T- Lymphozytenreaktivität auf Diabetes-assoziierte Autoantigene bei Typ I Diabetikern, ihren Verwandten ersten Grades und gesunden Kontrollpersonen nachweisbar ist. Dabei soll gleichzeitig geprüft werden, ob sich diese Reaktivität zwischen den Gruppen unterscheidet. Als Kontrollantigene werden zum einen das Mitogen PHA (Phytohämagglutinin), das unspezifisch Zellen stimuliert, zum anderen das Recall- Antigen Tetanus-Toxoid (als spezifisches Antigen) getestet.

### 5.1 Die Auswahl der Testpersonen

Der Autoimmunprozeß, der in der Zerstörung der Beta- Zellen mündet, beginnt lange vor der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus.

Auf dem Boden einer genetischen Disposition kommt es, vermutlich unter Einwirkung anderer Umweltfaktoren, wie z.B. Viren, zur Auslösung der Insulitis.

Diese verläuft offenbar über Monate oder Jahre und führt zur fortlaufenden Zerstörung der Beta- Zellen. Dabei sind zunächst die Nüchternblutzuckerwerte und die postprandialen Blutzuckerwerte noch normal. Ab einem gewissen Grad der Inselschädigung kann dann als erste Anomalie der Insulinsekretion im intravenösen Glucosetoleranztest eine Verminderung oder ein Fehlen der frühen Insulinantwort auf intravenöse Glucosegabe nachgewiesen werden (Srikanta et al., 1984).

Erst wenn die Menge der Beta- Zellen um ca. 80% abgenommen hat, macht sich der daraus resultierende Insulinmangel auch klinisch als Manifestation des Diabetes bemerkbar. Es kommt zum Anstieg der Nüchternblutzuckerwerte und der postprandialen Blutzuckerwerte. Relativ plötzlich treten die Symptome wie Heißhunger, Polyurie, Polydipsie, Gewichtsabnahme, Abgeschlagenheit und Mattigkeit auf.

Nach der klinischen Manifestation kommt es meist einige Wochen später zu einer Remissionsphase, in der die inzwischen eingeleitete Insulintherapie oft deutlich reduziert werden kann. Offensichtlich kommt es in dieser sogenannten „Honeymoon- Periode“ zu einer Erholung der verbliebenen Beta- Zellen mit einer vorübergehenden Zunahme der körpereigenen Insulinproduktion. In der Regel endet diese Remissionsphase nach ca. 6 - 18 Monaten. Dann sind die Beta- Zellen weitestgehend zugrunde gegangen. Der Autoimmunprozess brennt langsam aus.

Die folgende Abbildung veranschaulicht nochmals die zeitliche Abfolge.

$\beta$  - Zellaktivität ( % )

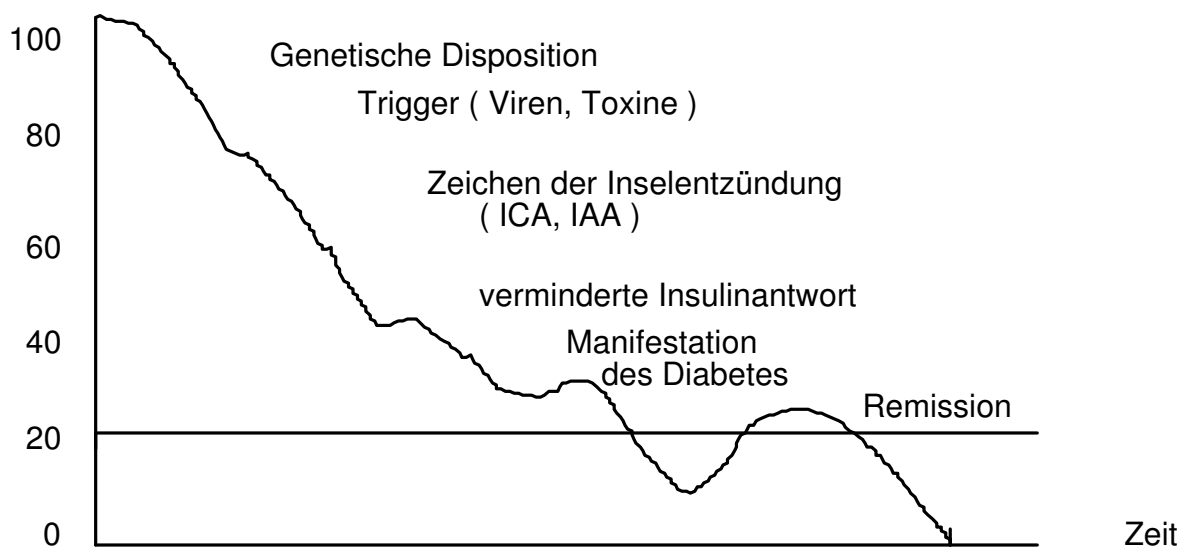


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I  
(Kuglin et al., 1989)

Es kann also davon ausgegangen werden, dass bei Typ I Diabetikern mit längerer Krankengeschichte der Autoimmunprozeß bereits abgeschlossen ist, während bei frisch manifestierten Diabetikern noch autoimmunologische Vorgänge nachweisbar sein müßten.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an frisch diagnostizierten Typ I Diabetikern durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte innerhalb zwei Wochen nach der Diagnosestellung und vor Gabe der ersten Insulindosis.

Die größte autoimmunologische Aktivität müßte allerdings bei Personen mit noch normaler Stoffwechsellage aber bereits laufender Insulitis und beginnender Destruktion der Beta- Zellen bestehen. Mit dem Ziel solche sogenannten Prädiabetiker zu identifizieren, untersuchten wir Verwandte ersten Grades von Typ I Diabetikern, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes

mellitus Typ I haben, insbesondere, wenn Inselzell- Antikörper nachweisbar sind.

Als Kontrollpersonen dienten gesunde, nicht- diabetische Personen, die keine Typ I Diabetiker in der Familienanamnese aufwiesen.

## **5.2 Alter der Testpersonen**

In den untersuchten Gruppen (frisch manifestierte Typ I Diabetiker, Verwandte ersten Grades und gesunde Kontrollpersonen) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters. Der insulinpflichtige Diabetes mellitus tritt vorwiegend bis zum 30. Lebensjahr auf. In zunehmendem Maß wird er jedoch bei älteren Patienten in Form des „latenten Autoimmun- Diabetes der Erwachsenen“ (LADA) diagnostiziert. Das durchschnittliche Lebensalter betrug bei den hier untersuchten Typ I Diabetikern zum Zeitpunkt der Manifestation 30,6 Jahre (Standardabweichung 10,5 Jahre).

## **5.3 Geschlechtsverteilung in den Gruppen**

Innerhalb der Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechtsunterschiede. Für den Diabetes mellitus ist keine Bevorzugung eines Geschlechts bekannt.

## **5.4 Antikörper- Bestimmungen**

Als Marker für die bestehende autoimmunologische Aktivität wurde eine Bestimmung der Inselzell- Antikörper herangezogen. Äquivalent zu dem zeitlichen Verlauf der Zerstörung der Beta- Zellen und damit zum zeitlichen Verlauf des immunologischen Geschehens treten diese Autoantikörper auf: Sie sind bereits vor der Diabetes- Manifestation nachweisbar und verschwinden mit

zunehmender Krankheitsdauer aus dem Serum der Patienten (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989; Mustonen, 1984; Lendrum et al., 1976). Bei den hier untersuchten 17 frisch manifestierten Typ I Diabetikern war bei zehn Personen (58,8%) ein ICA- Titer nachweisbar, zwei (11,8%) zeigten nur einen grenzwertigen ICA- Titer und bei fünf der Diabetiker (29,4%) waren keine Inselzell- Antikörper nachweisbar. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Werten. Einige Autoren beschrieben Fälle der klinischen Manifestation eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus ohne Nachweis von Inselzell- Antikörpern (Lendrum et al., 1975; Kolb et al., 1988; Bruining et al., 1989).

Bei den Verwandten ersten Grades wurde ebenfalls eine Bestimmung der Inselzell- Antikörper durchgeführt. Nach WHO Kriterien werden die Personen mit positivem ICA- Titer (in der Regel größer 40 JDF- Units) als Prädiabetiker bezeichnet, da sie ein hohes Risiko für die Erkrankung an Diabetes mellitus Typ I haben. Sie können erst nach Diabetes- Manifestation retrospektiv als echte Prädiabetiker bezeichnet werden.

Nach Maclaren besteht ein direkter Zusammenhang zwischen ICA- Titerhöhe und der Entwicklung eines manifesten Diabetes bei Prädiabetikern (Maclaren, 1988). Nach Karjaleinen können nur hohe und persistierende ICA- Titer (mehr als 18 JDF- Units) einen späteren Typ I Diabetes voraussagen (Karjalainen, 1990). Auch Spencer beschrieb, dass das Risiko nur bei einer langen Persistenz der Inselzell- Antikörper über Monate bis Jahre erhöht zu sein scheint (Spencer et al., 1984). Allerdings sind nach Riley besonders die hochtitrigen Inselzell- Antikörper lange persistent (Riley et al., 1984).

Nach Roep ist der prädiktive Wert der Inselzell- Antikörper abhängig vom Alter, Verwandtheitsgrad der Person mit einem Typ I Diabetiker, Höhe des ICA- Titers und evtl. noch weiteren bisher unbekannten Parametern (Roep et al., 1992).



Bei den hier untersuchten sieben Verwandten ersten Grades war lediglich eine Person (14.3%) mit 40 JDF- Units ICA- positiv. Eine Person (14,3%) hatte mit 5 JDF- Units einen grenzwertigen Titer und bei fünf Personen (71,4%) waren keine Inselzell- Antikörper nachweisbar.

Bei allen nicht- diabetischen Kontrollpersonen waren keine Inselzell- Antikörper nachweisbar.

## **5.5 Periphere Lymphozyten des Blutes**

Die Anzahlen der peripheren Lymphozyten von ICA- negativen Kontrollpersonen (n=17) und ICA- positiven Personen (ein Verwandter ersten Grades sowie zehn frisch manifestierte Diabetiker) und ICA- grenzwertigen Personen (ein Verwandter ersten Grades sowie zwei frisch manifestierte Typ I Diabetiker) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Unterschiedliches Alter oder Geschlecht beeinflussten die Zellzahlen nicht.

Auch bei früheren Untersuchungen zu den peripheren Lymphozyten bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Buschard et al., 1983; Eliashiv et al., 1978; Omar et al., 1983).

Bekannt sind allerdings Unterschiede in der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen bei Prädiabetikern, frisch manifestierten sowie Diabetikern mit längerer Krankheitsdauer im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ohne Risiko für einen Typ I Diabetes. Dabei zeigt sich eine deutliche Fokussierung auf die T- Lymphozyten:

Prädiabetiker und frisch manifestierte Diabetiker weisen einen signifikant höheren Anteil an aktivierten T- Lymphozyten auf als gesunde Kontrollpersonen (Jackson et al., 1982; Ilonen et al., 1984; Ilonen et al., 1991). Dabei wurde sowohl eine Bevorzugung von HLA- DR3 positiven (Pozzilli et al., 1983), als

auch von HLA- DR4 positiven Personen (Ilonen et al., 1984) postuliert. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung geht die Zahl aktivierter T- Lymphozyten jedoch zurück, ihre Anzahl bleibt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen aber erhöht (Alviggi et al., 1984).

Kontainen bewies durch Analyse der V $\beta$ - Ketten der Rezeptoren auf den aktivierten Lymphozyten, dass es sich um eine oligoklonale Aktivierung handelt (Kontainen et al., 1991<sup>1</sup>).

Weiterhin wurde die Korrelation zwischen dem Vorhandensein aktivierter T- Lymphozyten und der Anwesenheit von Inselzell- Antikörpern und deren Titerhöhe untersucht: Einige Autoren beobachteten keine derartige Korrelation (Ziegler et al., 1987; Pozzilli et al., 1983), wohingegen Peakman für ICA- positive Diabetiker und Verwandte ersten Grades über erhöhte Zahlen von aktivierten CD4<sup>+</sup> T- Helfer- Zellen berichtet (Peakman et al., 1994).

## **5.6 Antigen- spezifische T- Zellreaktivität**

### **5.6.1 Spezifische Reaktivität auf Tetanus- Toxoid**

Als Positiv- Kontrolle war aus den Lymphozyten aller Test- und Kontrollpersonen eine Zelllinie auf Tetanus- Toxoid gebildet worden, deren spezifische Proliferation ebenfalls gemessen wurde. Dieser Ansatz erfolgte unter der Vorstellung, dass Tetanol durch Impfungen gegen Wundstarrkrampf ein bekanntes Antigen darstellt, und sich somit bei allen Personen Tetanol- spezifische Zelllinien generieren lassen müßten.

Für Tetanol ergab die Messung der 3H- Thymidin- Aufnahme in den drei Gruppen (Typ I Diabetiker, Verwandte ersten Grades und gesunde Kontrollpersonen) erwartungsgemäß häufige T- Zellantworten, Unterschiede zwischen den Gruppen gab es dabei nicht.

Betrachtet man die Proliferationsindizes größer / gleich 2, kann in der Gruppe der Diabetiker in 37,5% der Fälle, in der Gruppe der Verwandten ersten Grades

in 71% der Fälle sowie in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen in 59% der Fälle von einer spezifischen Proliferation ausgegangen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell nach dem hier durchgeführten Versuchsprotokoll Antigen- spezifische Zelllinien gebildet werden können und ihre Antigen- spezifische Proliferation messbar ist.

### **5.6.2 Spezifische T- Zellproliferation auf Inselzellhomogenat**

Ziel des Versuches war es, zu prüfen, ob Lymphozyten frisch manifestierter Typ I Diabetiker Insulin- produzierende Beta- Zellen erkennen und mit einer gesteigerten Proliferation auf sie reagieren. Ebenso wurden Lymphozyten von Verwandten ersten Grades untersucht. Als Kontrolle dienten Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen, unter der Vorstellung, dass diese keine gesteigerte Proliferation gegenüber den Autoantigenen zeigen.

Dafür wurden durch Kokultivierung von frisch isolierten peripheren Lymphozyten mit homogenisierten humanen Inseln T- Zelllinien gebildet. In dem anschließend durchgeführten Proliferationsassay wurden die Zellen dieser Zelllinien nochmals mit dem Homogenat der humanen Inseln stimuliert. Durch Messung der <sup>3</sup>H- Thymidin- Inkorporation konnte die Proliferation auf das Antigen bestimmt werden. Als Vergleich wurde die <sup>3</sup>H- Thymidin- Aufnahme der Zellen unter Abwesenheit von Antigen bestimmt. Als Positiv- Kontrolle wurde die Proliferation auf das unspezifische Lektin Phytohämagglutinin PHA gemessen.

Die Ergebnisse zeigen tendenziell eine häufigere Reaktivität auf homogenisierte Inselzellen bei Typ I Diabetiker und Kontrollpersonen als bei Verwandten ersten Grades. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Die verminderte T- Zellreaktivität bei Verwandten ersten Grades ist möglicherweise auf eine Änderung der Immunbalance in der prädiabetischen Phase

zurückzuführen. Erst Nachbeobachtungen können jedoch zeigen, ob es sich bei den untersuchten Verwandten ersten Grades um echte Prädiabetiker handelt. In der Diabetiker- Gruppe konnten keine Abhängigkeiten von der Höhe der ICA- Titer festgestellt werden.

Durch eine zweite Stimulation mit dem Inselhomogenat war keine verbesserte Reaktion nachweisbar, dabei war der Probenumfang allerdings zu gering, als dass eine statistische Aussage getroffen werden kann.

Ähnliche Versuche sind auch in der Literatur beschrieben. So untersuchte vanVliet die Beta- Zell- spezifische T- Zellreaktivität im peripheren Blut von diabetischen Kindern mit einer Krankheitsdauer von null Tagen bis zwei Jahren. Da humane Inselzellen für sie nicht in ausreichenden Mengen verfügbar waren, setzte sie Ratteninsulinoma- Zellen RINm5F als Antigen ein, welche sie ebenfalls homogenisierte. Nach Bildung Antigen- spezifischer T- Zelllinien untersuchte sie die Antigen- spezifische Proliferation dieser Zellen. Als Negativ- Kontrolle dienten Rattenfibroblasten- Membranen. Die Insulinoma- spezifische Proliferation war bei den diabetischen Kindern 4- bis 5-fach höher als die Fibroblasten- spezifische Proliferation. Drei Versuche, Zelllinien von Lymphozyten gesunder Personen auf Ratteninsulinoma- Membranen zu bilden, mißlangen (vanVliet et al., 1989).

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte nochmals die T- Zellreaktivität auf Beta- Zellmembranen einer großen Gruppe diabetischer Kinder im Vergleich zu nicht- diabetischen Kindern. Es wurden homogenisierte Präparationen von Ratten- Insulinoma- Gewebe, welche mit Insulin- sekretorischen Granula angereichert worden waren, als Antigene eingesetzt. Ein Großteil der diabetischen Kinder (27 von 40 Kindern, entsprechend 67 %) zeigte eine spezifische Proliferation auf die Präparationen der Beta- Zellen mit einem mittleren Proliferationsindex von 37.0. Proportional zur Krankheitsdauer reduzierte sich die Reaktivität auf die Beta-

Zellmembranen. Nicht- diabetische Kinder zeigten entweder keine oder allenfalls eine geringe spezifische Proliferation (4 von 48 Kinder, entsprechend 8%, mittlerer Proliferationsindex 3.4) (Roep et al., 1995).

Vergleichend setzte die Arbeitsgruppe homogenisierte Ratten- Insulinoma- Gewebe ohne Anreicherung mit Insulin- sekretorischen Granula ein. Die Proliferation auf dieses Antigen war geringer als auf die mit Insulin- sekretorischen Granula angereicherten Präparationen, Unterschiede zwischen Diabetikern und Kontrollen waren bei dieser Art des Beta- Zellantigens deutlich geringer bzw. nicht nachweisbar (Roep et al., 1995).

Auch die Arbeitsgruppe um Harrison beschäftigte sich mit der T- Zell- Reaktivität auf Beta- Zellen. Diese Gruppe setzte jedoch intakte Inseln ein. Isolierte periphere Lymphozyten von Typ I Diabetikern und Prädiabetikern wurden mit intakten humanen Inselzellen sowie, da humane Inseln nicht ausreichend zur Verfügung standen, mit intakten fetalen Schweine- Pro- Inseln, kokultiviert. Anschließend wurde die <sup>3</sup>H- Thymidin- Aufnahme gemessen. Dabei zeigten alle Prädiabetiker eine signifikante Antwort auf die humanen Inseln. Die Proliferation auf die fetalen Schweine- Pro- Inseln war ebenfalls signifikant erhöht, im Vergleich zu der Proliferation auf humane Inseln jedoch geringer. Die Proliferation der manifesten Diabetiker war variabel (Harrison et al., 1991).

In einem weiteren Versuch untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die Proliferation peripherer Lymphozyten von Prädiabetikern und frisch manifestierten Typ I Diabetikern auf mit Ultraschall homogenisierte fetale Schweine- Pro- Inseln. Die Prädiabetiker zeigten hier eine größere spezifische Proliferation (mittlerer Proliferationsindex  $6.10 \pm 6.50$ ) als die frisch- manifestierten Typ I Diabetikern mit einem mittleren Proliferationsindex von  $3.66 \pm 3.35$ . Die gesunden Kontrollen zeigten eine signifikant niedrigere Proliferation (mittlerer Proliferationsindex von  $1.63 \pm 0.62$ ) (Harrison et al., 1992).

In diesem Versuch von Harrison war die Beta- Zell- Reaktivität auf die mit Ultraschall homogenisierten Schweine- Pro- Inseln niedriger als in dem ersten Versuch der Arbeitsgruppe, in dem vollständige Pro- Inseln eingesetzt wurden. Äquivalent dazu berichtet Roep über eine verminderte T- Zellreaktivität bei diabetischen Kindern auf Insulinoma- Gewebe, welches mit Ultraschall homogenisiert worden war (Roep et al., 1995).

Im Gegensatz dazu berichtet jedoch Kontainen über eine gute T- Zellreaktivität bei Typ I Diabetikern auf ein Ultraschallhomogenat aus humanen Inseln. Er kokultivierte das Ultraschallhomogenat aus humanen Inseln mit Lymphozyten frisch diagnostizierter Typ I Diabetiker. In einem anschließend durchgeführten Proliferationsassay konnte er eine spezifische Proliferation auf das Ultraschallhomogenat zeigen. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen keine Reaktivität gegenüber Ultraschallpräparationen von exokrinem Pankreasgewebe und Schilddrüsengewebe. Gereinigte Membranen und Proteinpräparationen aus den Inseln konnten keine spezifische Proliferation induzieren. Kontainen folgerte daraus, dass die Antigenität der Inselzellen mit weiterer Fraktionierung der Zellen verloren geht (Kontainen et al., 1991).

Es bleibt also unklar, ob die Lymphozyten die intakte Beta- Zelle bzw. sogar die intakte Insel oder homogenisierte Beta- Zellen erkennen. Anders formuliert lautet die Frage, ob die Antigenität bedingt ist durch die intakte Zelle oder durch einzelne Membranproteine.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte durch die Homogenisierung eine Freisetzung antigener Strukturen erzielt werden. Unter der Vorstellung, dass eine Homogenisierung mit Ultraschall eine noch stärkere Fraktionierung der Inseln und damit eine verbesserte Freisetzung von Antigenen bewirkt, wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob eine spezifische Proliferation der T- Zellen von Typ I Diabetikern und ihren Verwandten ersten Grades auf mit Ultraschall homogenisierte humane Inseln nachzuweisen ist. Dabei konnte man tendenziell

eine bessere Reaktion der Lymphozyten der Typ I Diabetiker und der Verwandten ersten Grades im Vergleich zu den Zellen gesunder Kontrollpersonen nachweisen. Allerdings ist der Probenumfang zu gering, um eine sichere statistische Aussage zu treffen. In der Diabetiker- Gruppe konnten keine Abhängigkeiten von der Höhe der ICA- Titer festgestellt werden. Eine zweite Stimulation mit Ultraschallhomogenat führte zu keiner verbesserten spezifischen Proliferation.

Es ist jedoch auch denkbar, dass durch die zunehmende Homogenisierung eine Antigen- Denaturierung stattfindet. Dies könnte verantwortlich dafür sein, dass in den hier durchgeführten Versuchen, sowohl nach grober Homogenisierung als auch nach Homogenisierung mit Ultraschall keine eindeutige spezifische T- Zellproliferation bei Prädiabetikern und frisch manifestierten Typ I Diabetikern nachweisbar war.

### **5.6.3 Spezifische T- Zell- Proliferation auf Glutaminsäure- Decarboxylase**

Mit der Entdeckung eines Antikörpers gegen ein Membranprotein der Beta- Zelle (Baekkeskov et al.; 1982) wurde die Frage nach der Relevanz dieses Antigens für die T- Lymphozyten gestellt. Zunächst war von diesem Protein nur seine Molekülmasse von 64.000 Dalton bekannt, später wurde es identifiziert als das Enzym Glutaminsäure- Decarboxylase (Baekkeskov et al., 1990).

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise verdichtet, dass dieses Enzym, welches mit GAD abgekürzt wird, ein bedeutendes Autoantigen in der Pathogenese des Typ I Diabetes darstellt.

Im Tierversuch wurden von BB- Ratten Zelllinien isoliert, die eine spezifische Proliferation auf GAD zeigten. Es handelte sich dabei um CD4<sup>+</sup>- Zellen (Diaz et al.; 1992).

Sowohl Tisch als auch Kaufmann berichteten 1993 über eine zeitliche Koinzidenz des Auftretens der Insulitis und der Möglichkeit, GAD- reaktive T- Zellen und GAD- Antikörper bei der NOD- Maus nachzuweisen. Beide

berichteten weiterhin über eine zeitliche Abfolge im Auftreten von verschiedenen reaktiven T- Zelllinien. So lassen sich bei drei bis vier Wochen alten NOD- Mäusen zunächst gegen GAD gerichtete T- Zelllinien nachweisen. Nach sechs Wochen waren Zelllinien gegen andere Beta- Zellantigene wie Peripherin und Carboxypeptidase H nachweisbar. Äquivalente Befunde gab es bezüglich des Auftretens von Antikörpern. Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Injektion von GAD bei drei Wochen alten NOD- Mäusen im Sinne einer Toleranzentwicklung zu einer Reduktion der T- Zellproliferation auf GAD führt und die Diabetes- Entstehung verhindert bzw. verzögert (Tisch et al., 1993; Kaufman et al., 1993)

Auf diesem Hintergrund wurde in der hier vorliegenden Arbeit versucht, aus humanen Pankreasinseln das Enzym GAD zu isolieren und Zelllinien auf GAD zu bilden. Im Lymphozytenproliferationstest wurde die spezifische proliferative Antwort der T- Zelllinien auf GAD gemessen.

Bei Betrachtung der Mittelwerte der cpm der Diabetiker im Vergleich mit denen der Kontrollen lässt sich eine tendenziell größere Proliferation der Zelllinien auf das spezifische Antigen erkennen. Unter Berücksichtigung der „Background- Werte“ ergeben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede.

In der Diabetiker- Gruppe konnten keine Abhängigkeiten von der Höhe der ICA- Titer festgestellt werden.

In der Literatur wurden neben der Generierung von T- Zelllinien und der Messung der spezifischen Proliferation dieser Zellen auch primäre Lymphozytenproliferationsassays beschrieben: Atkinson verglich die spezifische Proliferation von T- Lymphozyten frisch manifestierter Typ I Diabetiker mit der gesunder Kontrollpersonen und konnte dabei eine signifikant höhere Proliferation auf GAD in der Diabetiker- Gruppe feststellen (Atkinson et al., 1992). Die Arbeitsgruppe um Panina- Bordignon konnte bei frisch



manifestierten Diabetikern CD8<sup>+</sup>- GAD- spezifische zytotoxische T- Zellen nachweisen (Panina- Bordignon et al., 1995). Lohmann versuchte, das dominante Epitop des Autoantigens GAD herauszufinden. Dabei setzte er beide bekannten Isoformen von GAD, GAD 65 und GAD 67, ein, und untersuchte die Reaktivität von peripheren Blut- T- Lymphozyten auf einzelne Peptid- Regionen dieser beiden Isoformen. Bei 13 von 15 Typ I Diabetikern war eine signifikante Antwort auf GAD 65- Peptide nachweisbar. Die Zellen reagierten dabei hauptsächlich auf die Region 473 - 555. Im Gegensatz dazu erkannten die T- Zellen gesunder Kontrollpersonen eine andere Region des Peptids (161 - 243). Die T- Zellantwort auf GAD 67 unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant. Die T- Zellen frisch manifestierter Diabetiker scheinen somit ein anderes Epitop von GAD zu erkennen als die Zellen der Kontrollpersonen. Lohmann schloss daraus, dass dieses Epitop von GAD 65 das relevante Target in der Pathogenese des insulinpflichtigen Diabetes mellitus darstellen könnte (Lohmann et al., 1994).

Weiss konnte durch *in vitro* Stimulation eine spezifische Reaktion von peripheren Blut- T- Lymphozyten auf GAD bei einem Typ I Diabetiker erzielen. Eine Untersuchung des T- Zellrezeptors und seiner CD3- Sequenz als der vermeintlichen Peptid- Bindungs- Region, zeigte im Gegensatz zur Untersuchung von Lohman hier eine oligoklonale Proliferationsantwort. Weiss schloss daraus, dass es entweder kein immunodominantes Epitop von GAD gibt, oder dass das Rezeptor- Repertoire der peripheren Blut- T- Lymphozyten ausgedehnt ist (Weiss et al., 1995).

Obwohl viele Arbeitsgruppen eine erhöhte T- Zell- Reaktivität auf GAD bei Typ I Diabetikern beschrieben, konnten diese Ergebnisse auf dem ersten T- Zellworkshop 1997 in Australien nicht bestätigt werden. Viele unterschiedliche Einflussgrößen wie Zellpräparation, -stimulation, Antigenherstellung und Assay- Bedingungen scheinen dabei eine Rolle zu spielen.

Bisher ist es nur wenigen Gruppen überhaupt gelungen, humane GAD-spezifische T- Zelllinien bzw. -klone zu generieren (Endl et al., 1997; Schloot et al., 1999; Lohmann et al., 1996; Schloot et al., 1997<sup>1</sup>, Schloot et al., 1997<sup>2</sup>).

Interessant ist, dass Epitope von GAD 65 die gleiche Aminosäure- Sequenz aufweisen wie das Coxsackie B- Virus. Damit könnte die antigene Sequenz von Coxsackie B- Viren im Sinne eines molekularen Mimikry dem körpereigenen GAD 65 so sehr ähneln, dass die durch die Infektion ausgelöste Immunantwort eine Kreuzreaktivität hat auf das Membranprotein GAD der Beta- Zelle und so die Zerstörung der Beta- Zelle einleitet. Untersuchungen zur spezifischen T- Zellproliferation auf diese Epitope von GAD waren allerdings bislang kontrovers (Schloot et al., 1997<sup>1</sup>; Endl et al., 1997; Kaufmann et al., 1992)

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Inselzellantigen- spezifische T- Zellreaktivität beim Diabetes mellitus Typ I zu untersuchen.

Unter der Vorstellung, dass bei frisch manifestierten Typ I Diabetikern die autoimmunologischen Vorgänge im Gegensatz zu Patienten mit längerer Krankheitsdauer noch nachweisbar sein müssten, wurden periphere Lymphozyten von Typ I Diabetikern unmittelbar nach Diagnosestellung und noch vor der ersten Insulin- Gabe isoliert. Außerdem wurden Lymphozyten gesunder Verwandter ersten Grades untersucht, mit der Überlegung, dass bei diesen Personen auf dem Boden der genetischen Disposition, prädiabetische autoimmunologische Vorgänge nachweisbar sind. Als Kontrolle dienten die Zellen gesunder Personen.

Zur Bildung von Antigen- spezifischen T- Zelllinien wurden die isolierten peripheren Lymphozyten kokultiviert mit Strukturen von humanen Inselzellen. Die humanen Inselzellen wurden dankenswerter Weise von Prof. Dr. R. G. Bretzel, Medizinische Klinik III und Poliklinik der Universitätsklinik Gießen zur Verfügung gestellt. Sie wurden auf verschiedene Weise weiterverarbeitet und als Antigene eingesetzt: Zum einen erfolgte eine grobe Homogenisierung der humanen Inseln, zum Anderen erfolgte eine Homogenisierung mittels Ultraschall. Weiterhin wurde die 64kD- Fraktion der Inseln isoliert. Als Kontrollantigen wurde das Recall- Antigen Tetanus- Toxoid eingesetzt. In einem nachfolgend durchgeführten Lymphozytenproliferationstest wurde untersucht, ob die Zellen dieser Zelllinien das jeweilige Antigen wiedererkennen und mit einer gesteigerten Proliferation reagieren.

Wie erwartet konnten mit dieser Methodik sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I (37,5 %), als auch bei Verwandten ersten Grades (71,4%) und Kontrollpersonen (58,8%) T- Zelllinien generiert werden, die mit dem Recall-Antigen Tetanus- Toxoid reagieren. Dies zeigt, dass der Antigen- spezifische Nachweis mit der durchgeführten Methodik möglich ist.

Tendenziell zeigte sich, dass Verwandte ersten Grades weniger häufig mit Inselzellhomogenat reagieren als Typ I Diabetiker oder gesunde Kontrollpersonen, was möglicherweise auf eine veränderte Immunreaktivität im prädiabetischen Stadium hindeutet.

Eine Homogenisierung der Inselzellen mittels Ultraschall ergab eine tendenziell bessere Reaktion der Lymphozyten der Typ I Diabetiker und der Verwandten ersten Grades im Vergleich zu den Zellen gesunder Kontrollpersonen. Ob dies an einer verbesserten Freisetzung antigener Strukturen durch die Ultraschallhomogenisierung bedingt ist, bleibt unklar.

Für die 64kD- Fraktion, von der bekannt ist, dass es sich dabei um das Membranprotein Gluaminsäure- Decarboxylase (GAD) handelt, konnten keine Unterschiede bei der spezifischen Proliferation bei den Typ I Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Tendenziell waren bei den Diabetikern zwar höhere Proliferationen auf GAD nachweisbar, aber nach Betrachtung der in dem Versuch erhöhten Mediumwerte muß gesagt werden, dass es sich dabei um keine spezifische Proliferation handelte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Inselzellantigen- reaktive Zellen bei allen unterschiedlichen Gruppen (Typ I Diabetiker, Verwandte ersten Grades, gesunde Kontrollpersonen) nachweisbar sind. Dabei ergaben sich tendenziell Unterschiede in der Reaktivität zwischen Typ I Diabetikern, Verwandten ersten

Grades und Kontrollpersonen für Inselhomogenat, während die Reaktivität auf 64kD nicht unterschiedlich war. Ein Signifikanzniveau wurde in allen Versuchen wegen des geringen Probenumfangs nicht erreicht. Ob die gefundenen, spezifischen T- Zellreaktionen für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I relevant sind, lässt sich nur in longitudinalen Studien untersuchen, in denen echte Prädiabetiker bis zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ I verfolgt und auf Veränderung der T- Zellantworten untersucht werden.

## 7 Literatur

Abbas, AK.; Murphy, KM.; Sher, A.  
Functional diversity of helper lymphocytes  
Nature 1996; 383: 787- 93

Ablamunits, V.; Elias, D.; Cohen, IR.  
The pathogenicity of islet- infiltrating lymphocytes in the non obese diabetic (NOD) mouse  
Clin Exp Immunol 1999; 115: 260-7

Adorini, L.; Aloisi, F.; Galbiati, F.; Gately, S.; Gregory, G.; Penna, F.; Ria, S.; Smiroldo, S.; Trembleau, S.  
Targeting Il-12 the key cytokine driving th1- mediated autoimmune disease  
Chem Immunol. 1997; 68: 175

Alviggi, L.; Hoskins, P.J.; Pyke, DA.; Johnston, C.; Tee, DEH.; Leslie, RDG.  
Pathogenesis of insulin dependent diabetes: a role for activated T lymphocytes  
Lancet 1984, 2: 4-6

Atkinson, MA.; Maclaren, NK.; Riley, WJ.; Winter, WE.; Fisk, DD.; Spillar, RP.  
Are Insulin Autoantibodies markers for insulin- dependent diabetes mellitus  
Diabetes, 1986; 35: 894-98

Atkinson, MA.; Kaufmann, DL.; Campbell, L.; Gibbs, KA.; Shah, SC.; Bu, DF.; Erlander, MG.; Tobin, AJ.; Maclaren, NK.  
Response of peripheral- blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin- dependent diabetes  
Lancet 1992; 339: 458-59

Baekkeskov, S.; Nielsen, JH.; Marner, B.; Bilde, T.; Ludvigsson, J.; Lenmark, A.  
Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins  
Nature 1982; 298: 167-9

Baekkeskov, S.; Aanstoot, T.; Christgau, S.; Reetz, A.; Solimena, M.; Cascalho, M.; Folli, F.; Richter-Oelsen, H.; Camilli, P.  
Identification of the 64k autoantigen in insulin- dependent diabetes as the GABA- synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase  
Nature 1990; 347: 151-56

Bach, JF.

Insulin- dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease  
Endocr Rev 1994; 15: 516-42

Barnett, AH.; Eff, C.; Leslie, RD; Pyke, DA.

Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs  
Diabetologia, 1981; 20: 87-93

Becker, F.; Helmke, K.; Bretzel, RG.; Seggewiss, K.; Sauer, H.; Federlin, K.  
Inselzell- (ICA); Insulin- (IAA) und andere Autoantikörper bei Typ-I-  
Diabetikern und ihren Familien: Prävalenz und klinische Korrelation.  
Gesellschaft für Innere Medizin 1988; 94: 1-6

Becker, F.; Helmke, K.; Seggewies, K.; Sauer, H.; Federlin, K.

Inselzell (ICA)- und Insulin (IAA)- sowie andere Autoantikörper als Marker der  
Autoimmunität von Typ I Diabetikern und ihren Verwandten 1. Grades  
Akt. Endokr. Stoffw. 1989; 10: 37-41

Bell, GI.; Aorita, S.; Koran, JH.

A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-  
dependent diabetes mellitus  
Diabetes 1984; 33: 176-83

Bendelac, AC.; Carnaudm, C.; Boitard, C., Bach, FC.

Syngenic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy  
neonates. Requirement for both Lyt2+ L3T4+ T- cells  
Exp Med 1987; 166: 823

Bennet, ST.; Lucassen, AM.; Gough, SLL.; Powell, EE.; Undlien, DE.;  
Pritchard, LE. et al.

Succesibility to human type I diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat  
variation at the insulin- gene minisatellite locus  
Nat Genet 1995; 9: 284-92

Beppu, H.; Winter, WE.; Atkinson, MA.; Maclaren, NK.; Fujita, K.;  
Takahshi, H.;

Bovine albumine antibodies in NOD mice  
Diabetes Research 1987; 6: 67 -9

Bertrams, J.

The HLA association of insulin- dependent (type 1) diabetes mellitus  
Behring.Inst.Mit. 1984 (75): 89-99

- Bingley, PJ.; Gale, EA.  
Rising incidence of IDDM in Europe  
Diabetes Care 1989; 12: 289-95
- Bingley, PJ.; Christie, MR.; Bonifacio, E.; Bonfanti, R.; Shattock, M.;  
Fonte, MT.; Bottazzo, GF., Gale, EA.  
Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell  
antibody- positive relatives  
Diabetes 1994; 43: 1304-10
- Bingley, PJ.; Bonifacio, E.; Williams, AJ.; Genovese, S., Bottazzo, GF,  
Gale, EA.  
Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations  
of autoantibody markers  
Diabetes 1997; 46: 1701-10
- Bingley, PK, Williams, AJ, Gale, EA.  
Optimised autoantibody- based risk assessment in family members. Implications  
for future intervention trails.  
Diabetes care 1999; 22: 1796-801
- Bingley, PJ.; Douek, IF.; Rogers, CA.; Gale, EA.,  
Bart´ s Oxford Study Group  
Influence of maternal age at delivery and birth order on risk of type 1 diabetes in  
childhood: prospective population based family study  
BMJ 2000; 321: 420-4
- Bland, BJ.  
International Pancreas Transplant Registry Annual Report for 1998  
ITPR Newsletter 1999; 11: 1-19
- Block, MB.; Berk, JE.; Fridhandler, LS. et al.  
Diabetic ketoacidosis associated with mumps virus infection  
Ann. Intern. Med. 1973; 78: 663-67
- Blom, L.; Dahlquist, G.; Nyström, L.; Sandström, A.; Wall, S.  
The Swedish childhood diabetes study- social and perinatal determinants for  
diabetes in childhood  
Diabetologia 1989; 32: 7-13
- Blom, L.; Nyström, L-; Dahlquist, G.  
The Swedish childhood diabetes study: vaccinations and infections as risk  
determinants for diabetes in childhood  
Diabetologia 1991; 34: 176-81



Boitard, C.; Yasunami, R.; Dardenne, M.; Bach JF.  
T- cell mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice  
J Exp Med 1989; 169: 1669- 80

Bonifacia, E.; Lampasona, V.; Genovese, S.; Ferrari, M.; Bosi, E.  
Identification of protein tyrosine- phosphatase- like IA2 (islet cell antigen 512)  
as the insulin- dependent diabetes related 37/40K autoantigen and a target of  
islet- cell antibodies  
J Immunol 1995; 155: 5419-26

Borch- Johnsen, K. et al.  
Relation between breast- feeding and incidence rates of IDDM  
The Lancet 1984; 10: 1083

Bottazzo, GF.; Florin- Christensen, A.; Doniach, D.  
Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine  
deficiencies  
Lancet 1974; 2: 1279-82

Bottazzo, GF.; Cudworth, AG.; Moul, DJ.; Doniach, D.; Festenstein, H.  
Evidence for a primary autoimmune type of diabetes mellitus (type Ib)  
BMJ 1978;2: 1253-55

Bottazzo, GF.; Dean, BM.; McNally, JM.; MacKay, EH.; Swift, PGF.;  
Gamble, DR.  
In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA  
molecules in the pancreas in diabetic insulitis  
N Engl J med 1985; 313: 353-60

Boyum, A.  
Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages  
Scand J Immun. 1976, 5 (Suppl.): 9-16

Brain, B.; Vas, M.R.; Lowenstein, T.  
Blood 1964, 23; 108

Brendel, MD.; Hering, BJ.; Schultz, AO.; Bretzel, RG.  
Adult islet allografts in type – 1 diabetic recipients  
ITR Newsletter2000; 8: 1-20

Bretzel, RG; Hering, BJ.; Stroedter, DC.; Federlin, K.  
Experimental islet transplantation in small animals  
In: Ricordi, C.(eds.) Pancreatic islet cell transplantation  
pp. 249-260, RG Landes. Georgetown, 1992

Bruining, GJ.; Grobbee, DE.; Scheffer, GJ.; de Bruyn, AM.; Molenaar, JL.; Hofman, A.; Bruining, H.A.; Valkenburg, HA  
Ten- year follow- up study of islet- cell antibodies and childhood diabetes mellitus  
Lancet 1989;1: 1100-2

Buschard, K.; Madsbad, S.; Mehlsen, J.; Rygaard, J.  
T- Lymphocyte Subsets in patients with newly diagnosed type 1 (insulin- dependent) diabetes mellitus . A prospective study  
Diabetologia 1983; 25: 247-251

Castano, L.; Eisenbarth, GS.  
Type 1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat  
Annu Rev Immunol 1990; 8: 647-79

Chan, SH. ; Yeo, PP.; Lee, BW.; Tan, SH.; Cheah, JS.; Wong, HB.  
HLA and insulin- dependent diabetes mellitus in Singaporean Chinese  
An Acad Med Singapore 1985; 14: 215-8

Chowdhury, TA.; Mijovic, CH., Barnett, AH.  
The aetiology of type I diabetes  
Baillieres best pract res Clin Endocrinol Metab 1999; 13: 181-95

Christianson, SW.; Shultz, LD.; Leiter, EH.  
Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD- Scid/ Scid mice.  
Relative contributions of CD4+ and CD8+ T- cells from diabetic versus prediabetic NOD. NON- Thy-1a donors  
Diabetes 1993; 42: 44-55

Christie, MR.; Pipeleers, DG.; Lenmark, A.; Baekkeskov, S.  
Cellular and subcellular localization of an Mr 64,000 protein autoantigen in insulin- dependent diabetes  
J Biol Chem 1990; 265 : 376-81

Claasen, M.; Diehl, V.; Kochsiek, K.  
Innere Medizin, 2. Auflage, 1993, Urban und Schwarzenberg,

Couper, JJ.; Steele, C.; Beresford, S.; Powell, T.; McCaul, K; Polhillard, A.; Gellert, S.; Tait, B.; Harrison, LC.; Colman, PG.;  
Lack of association between duration of rised feeding or introduction of cow´ s milk in development of islet autoimmunity  
Diabetes 1999; 48:2145-9

- Craig, ME.; Howard, NJ.; Silink, M; Chan, A.  
The rising incidence of childhood type 1 diabetes in New South Wales, Australia  
J Pediatr Endocrinol Metabol 2000,13: 363-72
- Cudworth, A.G.: Wolf, E.  
Genetic susceptibility to type 1 ( insulin - dependent ) diabetes mellitus  
Clin Endocrinol Metab 1982, 11: 389-408
- Dahlquist, G.; Blom, L.; Lönnberg, G.  
The Swedish Childhood Diabetes Study - a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups  
Diabetologia 1991; 34: 757-762
- Dahlquist, G.; Frisk, G., Ivason, SA.; Svanberg, L.; Forsgren, M.; Diderholm, H.  
Indications that maternal coxsackie B virus infection during pregnancy is a risk factor for childhood- onset IDDM  
Diabetologia 1995; 38: 1371-3
- Dahl- Jorgensen, K.; Joner, G.; Kristian, FH.  
Relationship between Cow´ s Milk Consumption and Incidence of IDDM in Childhood  
Diabetes care 1991; 14: 1081-83
- Daneman, D.; Fishman, L.; Clarson, C.; Martin, JM.  
Dietary triggers of insulin- dependent diabetes in BB- rat  
Diabetes research 1987; 5: 93-97
- Dean, BM.; Becker, F.; McNelly, JM.; Tarn, AC.; Schwartz, G.; Gale, EAM.; Bottazzo, GF.  
Insulin- antibodies in the prediabetic periode: Correlation with islet cell- antibodies and development of diabetes  
Diabetiologia 1986; 29: 339-42
- Diabetes epidemiology research international group  
Geographic patterns of childhood insulin- dependent diabetes mellitus  
Diabetes 1988; 37: 1113-9
- Diaz, JL.; Ways, J.; Hammonds, P.  
T- Lymphocyte Lines specific for Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) the 64K  $\beta$ - Cell Antigen of IDDM  
Diabetes 1992; 41:181-21

Eliashiv, A.; Olumide, F.; Norton, L.; Eiseman, B.  
Depression of cell- mediated immunity in diabetes  
Arch Surg 1978; 113: 1180-1183

Elliott, RB.; Martin, JM.  
Dietary protein: a trigger of insulin- dependent diabetes in the B rat ?  
Diabetologia 1984; 26: 297-99

Elliott, RB.; Reddy, SN.; Bibby, NJ.; Kida, K.  
Dietary prevention of diabetes in the NOD mouse  
Diabetologia 1988; 30 : 62 - 64

Endl, J.; Otto, H.; Jung, G.; Dreisbusch, B.; Donie, F.; Stahl, P.; Elbracht, R.;  
Schmitz, G.; Meinel, E.; Hummel, M.; Ziegler, AG.; Wank, R.; Schendel, DJ.  
Identification of naturally processed T cell epitopes from Glutamic Acid  
Decarboxylase presented in the context of HLA- DR Alleles by T lymphocytes  
of recent onset IDDM patients  
J Clin Invest 1997; 99: 2405-15

Expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus  
Diabetes Care 1997; 20; 1183-1197

Fear, NT.; McKinney, PA.; Patterson, CC.; Parslow, RC.; Bodansky, HJ.  
Childhood type I diabetes mellitus and parental occupation involving social  
mixing and infectious contacts: two population- based case- control studies  
Diabet Med 1999; 16: 1025-9

Federlin, K.; Bretzel, RG.  
The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of  
the rat  
World J Surg 1984; 8: 169-177

Federlin, K.; Jahr, H.; Bretzel, RG.  
Islet transplantation as treatment of type 1 diabetes: from experimental  
beginnings to clinical application  
Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109: 373-383

Foulis, AK.; Liddle, CN.; Farquharson, MM.; Richmond, JA.; Weir, RS.  
The histopathology of the pancreas in type I (insulin- dependent) diabetes  
mellitus: a 25- year review of deaths in patients under 20 years of age in the  
United Kingdom  
Diabetologia 1986; 29: 267-74

Gardner, SG; Bingley, PJ., Sawtell, PA; Weeks, S.; Gale, EAM.  
The Bart's oxford study Group  
Rising incidence of insulin- dependent diabetes in children aged under 5 years in the Oxford region; time trend analysis  
BMJ 1997; 315: 713-7

Gardner, SG.; Gale EAM.; Williams, AJ.; Gillespie, KM.; Lawrence, KE.; Bottazzo, GF.; Bingley, PJ  
Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable ?  
Diabetes Care 1999; 22: 2049-54

Gately, MK.; Renzetti, LM.; Magram, J.; Stern, AS.; Adorini, L.; Gubler, U.; Presky, DH.  
The interleukin- 12 / interleukin- 12 receptor system: Role in normal and pathologic immune responses  
Annu Rev Immunol. 1998; 16: 495

Gepts, W.  
Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus  
Diabetes 1965; 14: 619-33

Ginsberg- Fellner, F.; Klein, E.; Dobersen, M.; Jenson, AB. et al.  
The interrelationship of congenital rubella and insulin- dependent diabetes mellitus  
Pediatr Res 1980, 14: 572

Gleichmann, H.; Bottazzo, GF.  
Progress towards standardization of cytoplasmic islet cell antibodies assay  
Diabetes 1987; 37: 578-84

Glerum, M.; Robinson, BH.; Martin, JM.  
Could bovine serum albumin be the initiating antigen ultimately responsible for the development of IDDM  
Diabetes Res 1989; 10: 103-7

Gorsuch, AN.; Spencer, KM.; Lister, J., McNelly, JM.; Dean, BM.; Bottazzo, GF., Cudworth, AG.  
The natural history of type 1 (insulin- dependent) diabetes mellitus: Evidence for a long prediabetic periode  
Lancet 1981; 2: 1336-65

Graves, PM.; Eisenbarth, GS.  
Pathogenesis, prediction and trials for the prevention of insulin dependent (type I) diabetes mellitus  
Adv Drug Deliv Rev 1999; 35: 143-156

Green, A.; Gale, EA.; Patterson, CC.  
Incidence of childhood- onset insulin- dependant diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study  
Lancet 1992, ii: 339: 905-9

Hägglöf, B.; Blom, L.; Lönnberg, G.; Sahlin, B.; Dahlquist, G.  
The Swedish childhood diabetes study : indications for severe psychological stress as a risk factor for Type 1 (insulin- dependent) diabetes in childhood  
Diabetologia 1991; 34: 579-83

Hamman, RF. ; Gay, EC. ; Cruickshanks, KJ. ; Lezotte, DJ.  
Colorado IDDM Registry  
Incidence and Validation of IDDM in children aged 0 - 17 yr  
Diabetes care 1990; 13 : 499-506

Harrison, LC.; Campbell, IL.; Colman, PG.; Chosich, N.; Kay, THW.; Tait, B.; Bartholomeusz, RK.; De Azipura, H.; Joseph, JL.; Chu, S. ; Kielczynski, WE.  
Type I diabetes : Immunopathology and immunotherapy.  
Adv Endocrinol Metab 1990; 1: 35-94

Harrison, LC.; De Aizpurua, H.; Loudovaris, T.; Campbell, IL.; Cebon, JS.; Tait, BD. ; Colman, PG.  
Reactivity to Human Islets and Feta Pig Proislets by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Subjects with Preclinical and clinical Insulin-Dependent Diabetes  
Diabetes 1991; 40: 1128- 33

Harrison, LC.; Chu, SX.; De Aizpurua, H.; Graham, M.; Honeyman, MC.; Colman, PG.  
Islet- reactive T cells are a marker of preclinical insulin- dependent diabetes  
J Clin Invest 1992; 89: 1161-5

Haskins, K.; Portas, M.; Bergman, B.; Lafferty, K., Bradley, B.  
Pancreatic islet- specific T- cell clones from non obese diabetic mice  
Proc Natl Acad Sci. USA 1989; 86: 8000-4

- Haskins, K.; McDuffie, M.  
Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4<sup>+</sup> islet- specific T- cell clone  
Science 1990; 249: 1433-36
- Hatfield, ECI.; Hawkes, CJ.; Payton, MA.; Christie, MR  
Cross- reactivity between IA-2 and phogrin/ IA-2-beta in binding of autoantibodies in IDDM  
Diabetologia 1997; 40: 1327
- Hauner, H.  
Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland  
Dtsch med Wschr 1998; 123: 777-782
- Healey, D.; Ozegbe, P.; Arden, S.; Chandler, J.; Hutton, J.; Cooke, A.  
In vivo activity and in vitro specificity of CD4<sup>+</sup> Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD- mice  
Clin Invest 1995; 95: 2979
- Helgason, T.; Jonasson, MR.  
Evidence for a food additive as a cause of ketosis- prone diabetes  
The Lancet 1981;3: 716 – 20
- Hinden, E.  
Mumps followed by diabetes  
Lancet 1962; 1: 1381
- Horowitz, MS.; Bradley, LM.; Habertson, J.; Krah, T.; Lee, J.; Sarvetnick, N.  
Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry  
Nat Med 1998; 4: 781-5
- Huff, JC.; Hierholzer, JC.; Farris, WA.  
An outbreak of juvenile Diabetes mellitus : Consideration of a viral etiology  
Am J Epidemiology 1974; 4: 277-87
- Hutchings, P.; Rosen, H.; O' Rilly, L., Simpson, E.; Gordon, S.; Cooke, A.  
Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion- promoting receptor on macrophages  
Nature 1990; 348: 639- 42

- Hyoty, H.; Hiltunen, M.; Knip, M.; Laakkonen, M.; Vahasalo, P.;  
Karjalainen, J. et al.  
A prospective Study of the role of Coxsackie B virus and other enterovirus  
infections in the pathogenesis of IDDM.  
Childhood Diabetes in Finland Study  
Diabetes 1995; 44: 652-7
- Ilonen, J.; Surcel, HM.; Mustonen, A.; Kläär, ML.; Akerblom, HA.  
Lymphocyte subpopulations at the onset of type 1 (insulin- dependent) diabetes  
Diabetologia 1984; 27: 106-108
- Ilonen, J.; Surcel, HM.; Käär, ML.  
Abnormalities within CD4 and CD8 T lymphocyte subsets in type 1 (insulin-  
dependent) diabetes  
Clin Exp Immunol 1991; 85: 278-281
- Inoue, K.; Mijamoto, M  
Islet transplantation  
J Hepatobiliary Pancreat Surg 2000 ; 7: 162-77
- Jackson, RA.; Morris, MA.; Haynes, BF.; Eisenbarth, GF.  
Increased circulating Ia - antigen- bearing T cells in type I diabetes mellitus  
New Engl J Med 1982; 306: 785-788
- Juhela, S., Hyoty, H. ; Roivainen, M. ; Harkonen, T. ; Putto- Laurila, A.,  
Simell, O.; Ilonen, J.  
T- cell responses to enteovirus antigens in children with type I diabetes  
Diabetes 2000; 49: 1308- 13
- Karjaleinen, J.  
Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high  
background incidence of disease  
Diabetes, 1990; 39: 1140- 50
- Katz, JD.; Benoist, C.; Mathis, D.  
T helper cell subsets in insulin- dependent diabetes  
Science 1995; 268: 1185
- Kaufmann, DL.; Erlander, MG.; Claesalzler, M.; Atkinson, MA.; Maclaren,  
NK.; Tobin, AJ.  
Autoimmunity to two forms of glutamate- decarboxylase in insulin - dependent  
diabetes mellitus  
J Clin Invest 1992; 89: 283-92



Kaufman, DL.; Clare-Salzer, M.; Tian, J.; Forsthuber, T.; Ting, GSP.; Robinson, P.; Atkinson, MA.; Sercarz, EE.; Tobin, JA.; Lehmann, PV.  
Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin- dependent diabetes  
Nature 1993; 366: 69-72 (letter)

Kikutani, H.; Makino, S.  
The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains  
Adv Immunol 1992; 51: 285

Klemetti, P.; Hyöty, H.; Roivanen, M.; Ilonen, J.; Savola, K.; Knip, M.; Akerblom, HK.; Vaaral, O.  
Relation between T- cell responses to glutamate decarboxylase and coxsackievirus B4 in patients with insulin- dependent diabetes mellitus  
J Clin Virol 1999; 14: 95-105

Knip, M.; Akerblom, HK.  
Environmental factors in the pathogenesis of type I diabetes mellitus  
Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999; 107 Suppl 3: 93-100

Knosp, S. ; Köhler, E. ; Rjasanowski, I. ; Titze, K.  
Autologous mixed lymphocyte reaction in newly diagnosed type I diabetes  
Exp Clin Endocrinol 1990; 95: 148-56

Kocova, M. ; Trucco, M. ; Konstantinova, M.; Dorman, JS.  
A cold spot of IDDM Incidence in Europe : Macedonia  
Diabetes Care 1993; 16: 1236-1240

Kolb, H.; Dannehl, K.; Grüneke, D.; Zielasek, J.; Bertrams, J.; Hübinger, A.; Gries, FA.  
Prospective analysis of islet cell antibodies in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes  
Diabetologia 1988 ; 31:189-194

Kontinen, S.; Toomath, R.; Lowdwe, J., Feldmann, M.  
Selective activation of T cells in newly diagnosed insulin- dependent diabetic patients: Evidence for heterogeneity of T cell receptor usage  
Clin Exp Immun 1991<sup>1</sup>; 83: 347-51

Kontinen, S.; James, RL.; Feldmann, M.  
Human islet cell induced T cell lines and clones from diabetic children  
Autoimmunity 1991<sup>2</sup>, 8: 193-197

Kostabra, JN.; Cruickshanks, KJ.; Lawler-Heavner, J.; Jobim, LF.; Rewers, MJ.; Gay, EC.; Chase, HP.; Klingensmith, G.; Hamman, RF.

Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM

Diabetes 1993; 42: 288-95

Kuglin, B.; Gries, FA.; Kolb, H.

Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment

Diabetes 1988; 37: 130

Kuglin, B.; Bertrams, J.; Kolb, H.; Gries, FA.

Früherkennung des Typ I Diabetes

Dtsch Med Wschr 1989; 114: 762-67

Kurrer, MO.; Pakala, SV.; Hanson, HL.; Katz, JD.

Beta cell apoptosis in T- cell mediated autoimmune diabetes

Proc natl acad sci 1997; 94: 213-18

Lacy, PE.; Konstantinovsky, M.

Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas

Diabetes 1967; 16: 35-39

Lampasona, V.; Bearzatto, M.; Genovese, S.; Bosi, E.; Ferrari, M; Bonifacio, E.

Autoantibodies in insulin- dependent diabetes recognizes distinct cytoplasmatic domains of the protein tyrosine phosphatase- like IA-2 autoantigen

J Immunol 1995; 157: 2707

Laron, Z.

Lessons from recent epidemiological studies in type I childhood diabetes

J Pediatr Endocrinol Metab 1999; 12 Suppl 3: 733-6

Lee, KL. ; Amano, K. ; Yoon, JW.

Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice

Diabetes 1988; 37: 989-91

Lendrum, R. ; Walker, IG.; Gamble, DR.

Islet cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset

Lancet 1975; 2: 880-2

Lendrum, R ; Walker, G. ; Cudworth, AG., Teophanidis, C.; Pyke, DA.; Bloom, A., Gamble, DR.

Islet cell antibodies in diabetes mellitus

Lancet 1976;2: 1273-6

Lernmark, A.; Sehlin, J.; Täljedal, I.; Kronman, H., Nerup, J.

Possible toxic effects of normal and diabetic patient serum on pancreatic B-bells

Diabetologia 1978; 14: 25-31

Levy- Marchal, C.; Patterson, C.; Green, A.

Variation by age group and seasonality at diagnosis of childhood IDDM in Europe

Diabetologia 1995; 38: 823-30

Liblau, R.; Singer, M.; McDevit, O.

Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T- cell in the pathogenesis of organ- specific autoimmune diseases

Immunol Today 1995; 16: 34

Like, AA.; Kislauskies, E.; Williams, RM, Rossini, AA.

Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in BB/ W rat

Science, 1982; 216: 644

Like, AA.; Biron, CA.; Werniger, EJ.; Byman, K.; Sroczynsky, E.,

Gubersky, DL.

Prevention of diabetes in Biobreeding/ Worcester rats with monoclonal antibodies that recognised t-lymphocytes or natural killer- cells

Exp Med 1986; 164: 1145-59

Lohmann, T.; Leslie, RD.; Hawa, M.; Geysen, M.; Rodda, SM.

Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 56 and 67 in insulin dependent diabetes mellitus

Lancet; 1994: 343: 1607-08

Lohmann, T.; Leslie, RD.; Londei, M.

T cell clones to epitopes of Glutamic Acid Decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin dependent diabetes

J Autoimmun 1996; 9: 385-9

Lohmann, T.; Kellner, K.; Verlohren, HJ.; Krug, J.; Steindorf, J., Scherbaum, WA.; Seissler, J.

Titre and combination of ICA and autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA)  
Diabetologia 2001; 44: 1005-1010

Maclaren, NK.

How, when, and why to predict IDDM  
Diabetes 1988, 37 : 1591-1594

Maclaren, NK.

Immunology of diabetes mellitus  
Ann Allergy 1992; 68: 5-9

Makino, S.; Kunimoto, K.; Muraoka, Y.; Mizushima, Y.; Katagiri, K.; Tochino, Y.

Breeding of a non- obese, diabetic strain of mice  
Exp Anim 1980; 29: 1-13

Mandrup- Poulsen, T.; Molwig, J.; Andersen, HU.; Helqvist, S.; Spinas, GA., Munck, M. et al.

Lack of predictive value of islet cell antibodies, insulin antibodies, and HLA -DR phenotype for remission in cyclosporine- treated IDDM patients  
Diabetes, 1990; 39: 204-10

Maron, R. Elias, D.; de Jongh, BM.; Bruining, GJ. ; Van Rood, JJ. ; Schechter, Y.; Cohen, IR.

Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin- dependent diabetes mellitus  
Nature 1983; 303: 817-18

Mc Crae, WM.

Diabetes mellitus following mumps  
Lancet 1963 ; 1: 1300-1

McEvoy, RC.; Witt, ME.; Ginsberg- Fellner, F.; Rubinstein, P.  
Anti- insulin antibodies in children with type I diabetes mellitus

Diabetes 1986; 35: 634-41

Menser, MA.; Forrest, JM.; Brandy, RD.

Rubella infection and diabetes mellitus  
Lancet 1978; i: 57-60

- Mikulecky, M.; Michalkova, D.; Petrovicova, A.  
Coxsackie's infection and births of future diabetic children : year, seasonality and secularity  
J Pediatr Endocrinol Metab 2000; 13: 523-7
- Minkowsky, O.  
Weitere Mitteilungen über den Diabetes mellitus nach Extirpation des Pancreas  
Berl Klin Wochenschr 1892; 29: 90-96
- Miyazaki, A.; Hanafusa, T.; Yamada, K.; Myagawa, J., Fujino- Kurihara, H.; Nakajima, H.; Nonaka, K.; Tarui, S.  
Predominance of T- lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre- diabetic non- obese- diabetic (NOD) mice:  
A longitudinal study  
Clin Exp Immunol 1985; 60: 622-30
- Mosmann, TR.; Cherwinsky, M.; Bond, M.; Giedlin, R.; Coffmann, L.  
Two types of murine helper T cell clone  
Definition according to profile of lymphocine activity and secreted proteins  
Immunoloc J 1986; 136: 2348
- Muntoni, S.; Songini, M.;  
Sardinian Collaborative Group of IDDM  
High incidence rate of IDDM in Sardinia  
Diabetes Care 1995; 18: 1600- 01
- Mustonen, A.  
Islet cell antibodies and HLA antigens in children with insulin- dependent diabetes mellitus  
Acta universitatis ouluensis Series D Medica 1984; 21
- Nagata, M. ; Yoon, JW.  
Studies on Autoimmunity for T- cell- mediated beta- cell destruction. Distinct difference in beta- cell destruction between CD4+ and CD8+ T- cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD- mice  
Diabetes 1992; 41: 998- 1008
- Najarian, JS.; Sutherland, DER.; Matas, AJ.; Steffes, MW.; Simmons, RL.; Goetz, FC.  
Human islet transplantation; a preliminary report.  
Transplant Proc 1977; 9: 233-236

Nistic, L. ; Buzzetti, R. ; Pritchard, LE.; Van der Antera, B.; Giovaninni, C.; Bosi, E. et al.

The CTLA – 4 gene region on chromosome 2q33 is linked to and associated with type I diabetes

Hum Mol Genet 1996; 5: 1075-80

Notkins, AL.; Lu, J.; Li, Q.; VanderVegt, FP.; Wasserfall, C.; MacLaren, NK; Lan, MS

IA-2 and IA-2beta are major autoantigens in IDDM and the precursors of the 40 kDa and 37 kDa tryptic fragments

J Autoimmun 1996; 9: 677-82

Ogawa, M.; Maruyama, T.; Hasegawa, T. et al.

The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non- obese (NOD) mice

Biomed Res 1985; 6: 103-5

Omar, MAK.; Pudifin, DJ.; Coovadia, HM.; Duursma, J.; Kiepiela, F.; Stretton, M.; Asmal, AC.

The Phytohaemagglutinin response and lymphocyte subpopulations in young Blacks and Indians with insulin- dependent diabetes mellitus

Afr Med J 1983, 63 : 776-778

O' Reilly, LA.; Hutchings, PR.; Crocker, E. ; Simson, T. ; Lund, D. ; Kiossis, F. ; Takei, J. et al.

Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD- mice : A fact of cell transfer and transgen expression

Eur J immunol 1991; 21: 1171-80

Palmer, J.; Asplin, CH.; Clemens, P.

Insulin- antibodies in insulin- dependent diabetics before insulin treatment

Science 1983; 222: 1337

Palmer, JP.; McCulloch, DK.

Prediction and prevention of IDDM

Diabetes 1991, 40: 943-7

Pancewyz, O.; Strom, T.; Rubin- Kelly, V.

Islet infiltrating T- cell clones from Non obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes

Eur J Immun 1991; 21: 873-79

Panina-Bordignon, P.; Lang, R.; van Endert, PM.; Benazzi, E.; Felix, AM.; Pastore, RM.; Spinas, GA.; Sinigaglia, F.  
Cytotoxic T- cells specific for Glutamic acid decarboxylase in autoimmune Diabetes  
J Exp Med 1995; 181: 1923-27

Paul, WE.; Seder, RA.  
Lymphocytes responses and cytokines  
Cell 1994; 76: 241

Peakman, M.; Warnock, T.; Vats, A.; McNab, G.L.; Underhill, J.; Donaldson, P.T.; Vergani, D.  
Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in children with type 1 diabetes and their first degree relatives  
Diabetologia 1994, 37 : 155-165

Petersen, JS.; Marshall, MO; Baekkeskov, S.; Hejnaes, KR.; Hoier- Madsen, M.; Dyrberg, T  
Transfer of type I (insulin- dependent) diabetes mellitus associated autoimmunity to mice with severe combined immunodeficiency (SCID)  
Diabetologia 1993; 36: 510-5

Petersen, JS; Hejnaes, KR.; Moody, A.; Karlsen, AE.; Marshall, MO.; Hoier- Madsen, M.; Boel, E.; Michelsen, BK.; Dyrberg, T.  
Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay  
Diabetes 1994; 34: 459- 67

Pilstrom, B.; Bjork, L.; Bohme, J.  
Demonstration of a Th1 cytokine profile in the late phase of NOD- insulitis  
Cytokine 1995; 7: 806-14

Pozzilli, P.; Zuccarini, O.; Andreani, D.; Lavicoli, M.; Sensi, M.; Spencer, KM.; Bottazzo, GF.; Beverly, PCL.; Kyner, JL.; Cudworth, AG.  
Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type 1 (insulin- dependent) diabetes  
Diabetes 1983, 32 : 91-94

Pugliese,A.; Kawasaki,E; Zeller,M; Yu,L.; Babu,S; Solimena, M.; Moraes,CT.; Pietropaolo,M.; Friday, RP., Trucco,M.; Ricordi,C.; Allen,M.; Noble,JA.; Erlich,HA.; Eisenbarth,GS.

Sequence analysis of the diabetes protective human leucocyte antigen - DQB1\*0602 allele in unaffected islet cell antibodies positive first degree relatives and in rare patients with type I diabetes

J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 1722-8

Rabin, DU.; Pleasic, SM.; Shapiro, JA.; Yoo- Warren, H.; Oles, J.; Hicks, JM.; Goldstein, DE.; Rae, PM.

Islet cell antigen 512 is a diabetic specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases

J Immunol 1994; 152: 3183-8

Räsänen, L.; Hyöty, H.; Lehto, M.; Kallioniemi, OP.; Antonen, J.; Huupponen, T.

Defective autologous mixed leukocyte reaction in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus

Clin Exp Immunol 1988; 71: 470-474

Reddy, SN.; Bibby, NJ.; Wu, S.; Swinney, C.; Barrow, G.; Elliott, RB.

A combined casein- free - nicotinamide diet provides diabetes in the NOD mouse with minimum insulinitis

Diabetes Res Clin Prac 1995; 29 : 83 - 92

Reich, EP. ; Scaringe, D. ; Yagi, J.; Sherwin, RS, Janeway, CA.

Prevention of diabetes in NOD- mice by injection of autoreactive T- lymphocytes

Diabetes 1989; 38: 1647- 51

Rennert, OM.; Francis, GL.

Update on the genetics and pathophysiology of type I diabetes mellitus

Pediatr Ann 1999; 28: 570-5

Ricordi, C.; Lacy, PE.; Finke, EH.; Olack, BJ.; Scharp, DW.

Automated method for isolation of human pancreatic islets

Diabetes 1988; 37: 413-20

Riley, W.; Maclaren, N.

Islet- cell- antibodies are seldom transient

Lancet 1984; 1: 1351-2



Robertson, RP.; Davis, C.; Larson, J.; Stratta, R.; Sutherland, DE.  
Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes  
Diabetes Care 2000; 23:112-6

Robertson, RP  
Successful islet transplantation for patients with Diabetes : fact or fantasy ?  
N Engl J Med 2000; 343: 289-90

Roep, BO.; Arden, SD.; de Vries, RRP.; Hutton, JC.  
T- cell clones from a type I diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins  
Nature 1990; 345: 632-34

Roep, BO.  
T- lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin- dependent) diabetes mellitus  
Erschienen im Verlag Alblasterdam, the Netherlands, 1992

Roep,BO.; de Vries, RRP.  
T- lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin- dependent) diabetes mellitus  
Eur J of clin Invest 1992; 22: 697-711

Roep, BO.; Kallan, AA.; Duinkerken, G.; Arden, SD.; Hutton, JC.; Bruining, GJ.; de Vries, RRP.  
T- cell reactivity to  $\beta$ - cell membrane antigens associated with  $\beta$ - cell destruction in IDDM  
Diabetes 1995; 44 : 278 - 83

Roep, BO.; Schipper, R.; Verduyn, W.; Bruining, GY.; Schreuder, GM.; De Vries, RR.  
HLA- DRB1\*0403 is associated with dominant protection against IDDM in the general Dutch population and subjects with high risk DQA1\*0301 - DQB1\*0302/ DQA1\*0501 - DQB1\*0201 genotype  
Tissue Antigens 1999; 54: 88-90

Saukkonen, T.; Savilahti, E.; Vaarala, O.; Virtala, ET.; Tuomilehto, J.; Akerblom, HK.; The Childhood Diabetes in Finland Study Group  
Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to Bovine Serum Albumin but not to Ovalbumin  
Diabetes Care 1994; 17: 970-76

Saukkonen, T.; Virtanen, SM.; Karppinen, M.; Reijonen, H.; Ilonen, J., Rasanen, L.; Akerblom, HK.; Savilahti, E.

Significance of cow's milk protein antibodies as risk factor for childhood IDDM: Interactions with dietary cow's milk intake and HLA- DQB1 genotype. Childhood diabetes Finland study group  
Diabetologia 1998; 41: 72-8

Samuelsson, U.; Johansson, C.; Ludvigsson, J.

Month of birth and risk of developing insulin dependent diabetes in south east Sweden  
Arch Dis Child 1999; 81: 143-6

Scharp, DW.; Lacy, PE.; Santiago, JW.; McCullough, CS.; Weide, L.; Boyle, PJ.; Falqui, L.; Marchetti, P.; Ricordi, C.; Gingerich, RL.; Jaffe, AS.; Cryer, PE.; Hanto, DW.; Anderson, CB.; Flye, MW.

Results of our first nine intraportal islets allografts in type 1, insulin- dependent diabetic patients  
Transplantation 1991; 51: 76-85

Schernthaner, G.; Hink, S.; Kopp, HP.; Muzyka, B.; Streit, G.; Kroiss, A.  
Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1,5 diabetes)  
Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109: 94-108

Schlott, NC.; Roep, BO.; Wegmann, BR.; Yu, L.; Wang, TB.; Eisenbarth, GS.  
T- cell reactivity to GAD 65 peptides sequences shared with Coxsackie virus protein in recent- onset IDDM, post- onset IDDM patients and control- subjects  
Diabetologia 1997<sup>1</sup>; 40: 332-8

Schlott, NC.; Roep, BO.

Islet antigen- specific T cell clones in autoimmune diabetes: from mice to men  
Diabetes Metab Rev 1997<sup>2</sup>; 13: 127-38

Schlott, NC.; Batstra, MC.; Duinkerken, G.; de Vries, RR.; Dyrberg, T.; Chaudhuri, A.; Behan, PO.; Roep, BO.

GAD65- reactive T- cell in a non- diabetic stiff- man syndrom patient  
J Autoimmun 1999; 12: 289-96

Schranz, DB.; Bekris, L.; Landin- Olsson, M.; Torn, C.; Nilang, A.; Toll, A.; Sjostrom, J.; Gronlund, H.; Lernmark, A.

Newly diagnosed latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is associated with low level glutamate decarboxylase (GAD65) and IA- 2 autoantibodies. Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS)  
Horm Metab Res 2000; 32: 133-138

Scott, FM.; Cloutier, HE.; Kleemann, R.; Woerz- Pagenstert, U.; Rowsell, H.; Modler, W.; Kolb, H.

Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats

Diabetes 1997; 46: 589-98

Seissler, J. et al.

Prävalenz von ICA in der Normalbevölkerung : 0,3 bis 3%

Deutsche med. Wochenschrift 1990; 115: 689

Seissler, J.; Hering, B.; Richter, W.; Glück, M.; Yassin, NGF.; Bretzel, RG.; Boehm, BO.; Federlin, K.; Scherbaum, WA.

Antibodies to the Mr 64,000 (64K) protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for impaired beta- cell function

Diabetologia 1992; 35: 550-4

Serjeantson, SW.; Ranfort, PR. ; Kirk, RL. ; Kohonen-Corish, MR.; Mohan, V.; Ramachandran, A.; Snehalatha, C.; Viswanathan, M.

HLA-DR and -DQ DNA genotyping in insulin - dependent diabetes patients in South India

Dis Markers 1987, 5: 101-8

Siegenthaler, W.; Kaufmann, W.; Waller, H.

Lehrbuch der Inneren Medizin

1992, 3.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York

Solimena, M.; Dirkx, R.; Hermel, JM.; Pleasic- Williams, S; Shapira, JA.; Caron, L.; Rabin, DU.

ICA 512, an autoantigen of type 1 diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules

EMBO J. 1996; 15: 2102

Srikanta, S.; Gamda, O.; Gleason, R.; Jackson, R.; Soeldner, J.; Eisenbarth, G.

Pre- type I diabetes - Linear loss of beta- cell response to intravenous glucose

Diabetes 1984, 33: 171-720

Srikanta, S.; Ricker, AT.; MacCulloch, DK.; Soeldner, JS.; Eisenbarth, GS., Palmern, SP.

Autoimmunity to insulin, beta- cell- dysfunction and development of IDDM

Diabetes, 1986; 39: 139-42

- Spencer, S.; Tarn, A.; Dean, BM.; Lister, J.; Bottazzo, GF.  
Fluctuating islet cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin- dependent diabetes  
Lancet 1984; i: 764- 66
- Svejgaard, A.; Platz, P.; Ryder, LP.; Nielsen, LS.; Thomsen, M.  
HLA and disease associations - a survey  
Transplant. Rev. 1975, 22 : 3-43
- Svejgaard, A.; Platz, P.; Ryder, LP.  
HLA and disease 1982 – a survey  
Immunol Rev 1983; 70: 193-218
- Tarn, AC.; Dean, BM.; Schwartz, G.; Thomas, JM.; Ingram, D.; Bottazo, GF, Gale, EAM.  
Predicting insulin- dependent diabetes  
Lancet 1988; 2: 845-50
- Thomsen, M.; Platz, P.; Andersen, O.O.; Christy, M.; Lyngsoe, J.; Nerup, J.; Rasmussen, K.; Ryder, LP.; Nielsen, LS.; Svejgaard, A.  
MLC- typing in juvenile diabetes mellitus and idiopathic Addison´ s disease  
Transplant Rev 1975; 22 : 125-47
- Tisch, R.; Yang, XD.; Singer, SM.; Liblau, RS.; Fugger, L.; McDevitt, HO.  
Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice  
Nature 1993; 366 : 72-75 (letter)
- Trampisch, HJ.; Windeler, J  
Medizinische Statistik  
Springer Verlag, 2. Auflage, 2000
- Tremblaeu, S.; Penna, G.; Bosi, E., Mortara, M.; Gately, K.; Adorini, L.  
IL- 12 administration induces Th1 cells and acceleration autoimmune diabetes in NOD- mice  
Exp Med 1995; 181: 817
- Trevisan, R.; Vedovato, M.; Tiengo, A.  
The epidemiology of diabetes mellitus  
Nephrol dial transplant 1998; 13 Suppl.8 : 2-5

Trinchieri, G.

Interleukin- 12: a proinflammatory cytokine with immuno regulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity

Anno Rev Immuno 1995; 13: 251

Tuomilehto, J.; Karvonen, M.; Pitkaniemi, J., Virtala, E.; Kohtamaki, K.; Toivanen, L. et al.

Record high incidence of type I insulin- dependent diabetes mellitus in Finland children

Diabetologia 1999; 42: 655-60

Undlien, DE.; Friede, T.; Rammensee, HG.; Joner, G.; Dahl-Jorgensen, K.; Sovik, O.; Akselsen, HE.; Knutsen, I.; Ronningen, KS.; Thorsby, E.

HLA- encoded genetic predisposition in IDDM : DR4 subtype may be associated with different degrees of protection

Diabetes 1997; 46: 143-9

Undlien, DE; Kockum, I.; Ronningen, KS.; Lowe, R.; Saanjeevi, CB; Graham, J.; Lie, BA.; Akselsen, HE.; Lemark, A.; Thorsby, E

HLA- associations in type I diabetes among patients not carrying high risk DR3 /DQ2 or DR4 /DQ8 haplotypes

Tissue Antigens 1999; 54: 543-51

vanVliet, E.; Roep, BO.; Meulenbroek, L.; Bruining, GJ.; deVries, RRP.

Human T cell clones with specificity for insulinoma cell antigens

Eur J Immunol 1989; 19: 213-16

Virtanen, SM.

Infant feeding in finish children < 7 yr of age with newly diagnosed IDDM

Diabetes care 1991; 14: 415-17

Virtanen, SM.; Räsänen, J.; Ylönen, K.; Aro, AI.; Clayton, D.; Langholz, B.; Pitkaniemi, J.; Savilahti, E.; Lounamaa, R.; Tuomilehto, J.; Akerblom, HK. and the childhood in diabetes in Finland Study Group

Early Introduction of dairy products associated with increased risk of IDDM in finish children

Diabetes 1993; 42: 1786-90

Voorbij, HAM.; Jeucken, PHM.; Kabel, PJ.; DeHaan, M., Drexhage, HA.;

Dendritic cells and scavenger macrophages in pancreatic islet of prediabetic BB-rats

Diabetes 1989; 38: 1623- 29

- Wasmeier, C.; Hutton, JC.  
Molecular cloning of phogrin, a protein tyrosine phosphatase homologue  
localizes to insulin secretory granule membranes  
J Biol. Chem. 1996; 271: 18161
- Wasmuth, HF.; Becker, F.; Seebaum, S.; Elliott, RB.; Federlin, K.  
Association of antibodies to  $\beta$ - Casein with type I Diabetes  
Autoimmunity 1995; 21 : A 328 (Abstract)
- Wang, B.; Gonzalez, A.; Benoist, C.; Mathis, D  
The role of CD8+ T- cells in the initiation of insulin- dependent diabetes  
mellitus  
Eur J Immunol 1996; 26: 1762-9
- Weimar, B.; Rauber, K.; Brendel, MD.; Bretzel, RG.; Rau, WS.  
Percutaneous transhepatic catheterization of the portal vein: a combined CT- and  
fluoroscopy- guided technique.  
Cardiovasc Intervent Radiol 1999; 22: 342-344
- Weiss, U.; Manfras, BJ.; Terjung, D.; Eiermann, T.; Wölpl, A.; Löliger, C.;  
Kühnl, P.; Boehm, BO.  
In vitro stimulation with Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) leads to an  
oligoclonal response of peripheral T- cells in an IDDM patient  
Scand J Immunol 1995; 42: 673-78
- Wen, L.; Wong, FS.; Burgly, L.; Altieri, M.; Mamalaki, C.; Kioussis, D. et al.  
Induction of insulinitis by glutamic acid decarboxylase peptide- specific and  
HLA-DQ8- restricted CD4+ T- cells from human DQ transgenic mice  
J Clin Invest 1998; 102: 947- 57
- WHO Report  
Diabetes mellitus, Report of a WHO Study group  
WHO technical report series 727  
WHO Genf 1985
- Williams, AJK.; Krug, J.; Lampeter, EF.; Mansfield, K.  
Raised temperature reduces the incidence of diabetes in NOD- mouse  
Diabetologia 1990; 33 : 635-37
- Wong, FS.; Visintin, I.; Wen, L.; Flavell, RA.; Janeway, CA.  
CD8+ T cell clones can transfer rapid onset of diabetes in NOD- mice in the  
absence of CD4+ cells  
J Exp Med 1996; 183; 67-76

- Yoon, JW.; Austin, M.; Onodera, T.; Notkins, AL.  
Virus- induced diabetes mellitus: beta- cell damage and insulin- dependent hyperglycaemia in mice infected with Coxsackie virus B4  
J Exp Med 1978; 148: 1080-86
- Yoon, JW.; Austin, M.; Onodera, T.; Notkins, AL.  
Virus- induced diabetes mellitus: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis  
New Eng J med 1979, 300: 1173-9
- Yoon, JW. ; London, NT.; Curfman, BL. ; Brown, RI. ; Notkins, AL.  
Coxsackie virus B4 produces transient diabetes in non - human primates  
Diabetes 1986; 35: 712-16
- Younaszai, R.; Sorenson, RL.; Lindall, AW.  
Homotransplantation of isolated pancreatic islets  
Diabetes 1970; 19: 406 (Abstract)
- Zekzer, D.; Wong, FS, Ayalon, O.; Millet, I.; Altieri, M.; Shintani; S.; Solimena, M.; Sherwin, RS  
GAD- reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice  
J Clin Invest 1998; 101: 68-73
- Ziegler, AG.; Standl, E.; Lander, T.; Nerl, C.; Rieber, EP.; Mehnert, H.  
Cell- mediated autoimmunity at the onset of insulin- dependent diabetes mellitus (IDDM)  
Klin Wochenschr 1987; 65: 546- 550
- Ziegler, AG.; Hummel, M.; Schenker, M.; Bonifacio, E.  
Autoantibodies appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2- year analysis of the German BABYDIAB Study  
Diabetes 1999; 48: 460-8

## 8 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
at. al	und anderer Autoren
BB	Biobreeding- Ratte (Inzucht- Ratte)
BSA	Bovines Serum- Albumin (Rinder- Serum- Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cpm	Counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAD	Glutaminsäure- Decarboxylase
GABA	Gamma- Amino- Buttersäure
HBSS	Hank´ s balanced salt solution
HLA	Human Leucocyte Antigen system
IAA	Insulin- Autoantikörper
IA-2	Inselzellantigen
ICA	Islet cell antibody, Inselzellantikörper
IDDM	Insulin- dependent diabetes mellitus, insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IgG	Immunglobulin
Il	Interleukin
IMDM	Iscoves´ s Modifiziertes Dulbecco´ s Medium (Zellkulturmedium)
INF	Interferon
IPTR	International Pancreas Transplant Registry
ITR	International Islet Transplant Registry
JDF	Juvenile Diabetes Foundation
kD	Kilo Dalton, Einheit des Molekulargewichts
LADA	Late onset Autoimmune Diabetes of the Adult = Latenter Autoimmun- Diabetes der Erwachsenen
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MLC	Mixed Lymphocyte reaction, gemischte Lymphozytenkultur
NaCl	Kochsalz
NOD	Non obese diabetic ( diabetische, nicht adipöse ) Maus
PBMNC´ s	Peripheral blood mononuclear cells, periphere mononukleäre Zellen des Bluts
PBS	Phosphat- buffered Saline, Phosphat- gepufferte Salzlösung
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Proliferationsindex



PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SD	Standarddeviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Th	T- Helfer- Zellen
TNF	Tumor- Nekrose- Faktor
v.a.	Vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	<u>Birthe</u> Dagmar Neetzel
Geburtsdatum	27. März 1967
Geburtsort	Brake / Unterweser
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

1973 - 1977	Grundschule Elsfleth
1977 - 1979	Orientierungsstufe Elsfleth
1979 - 1986	Gymnasium Brake
	Abschluß: Abitur

## Berufsausbildung

1986 - 1989	Ausbildung zur Krankengymnastin an der Loges- Schule- Nordsee in Oldenburg Abschluß: Staatsexamen
-------------	---

## Studium der Medizin

1989 - 1995	Studium der Humanmedizin an der Justus- Liebig- Universität Gießen
01. November 1995	Ärztliche Prüfung

## Ärztliche Weiterbildung

01/1996 – 06/ 1997	Ärztin im Praktikum am Zentrum für Innere Medizin, medizinische Klinik I Abteilung Kardiologie – Angiologie Universitätsklinik Gießen
Seit 07 / 1997	Assistenzärztin am Zentrum für Innere Medizin, medizinische Klinik I, Abteilung Kardiologie – Angiologie Universitätsklinik Gießen

Münzenberg, am 11. Juni 2003

## Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Federlin herzlich für die Überlassung dieses Themas und die Unterstützung während der Durchführung. Besonders danke ich ihm, für die Geduld und die immer wieder konstruktive Kritik.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. N.C. Schloot, die allzeit mit Rat und Tat, zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. B.O. Roep der Abteilung für Immunohämatologie und Bluttransfusionen des University Medical Centre in Leiden, Niederlande, bedanken. Dort durfte ich mehrere Tage hospitieren und erhielt eine umfassende Einführung in die Methodik der Zelllinien- Bildung. In vielen Diskussionen erhielt ich Anregungen für diese Dissertation.

Dem Transplantationsteam unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Bretzel an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus- Liebig- Universität Gießen danke ich für die Bereitstellung von humanen Langerhans´ schen Inseln. Bei Herrn Dr. C. Jaeger und den Mitarbeitern des Immunologischen Labors möchte ich mich für die praktische Unterstützung bedanken.

Für die statistische Betreuung danke ich Herrn Pabst des Instituts für medizinische Informatik an der Justus- Liebig Universität Gießen.

Ich veröffentliche die Arbeit in Gedenken an meinen Betreuer Herrn Dr. med. F. Becker, der leider im Verlauf verstarb.

Eine speziellen Dank möchte ich zum Schluss gegenüber meinen Eltern aussprechen, die mich immer unterstützt und gefördert haben.